



# Implication du gène *Arntl2* lié au rythme circadien dans le diabète de type 1

Basile Lebailly

## ► To cite this version:

Basile Lebailly. Implication du gène *Arntl2* lié au rythme circadien dans le diabète de type 1. Génétique. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066340 . tel-01263129

**HAL Id: tel-01263129**

**<https://theses.hal.science/tel-01263129>**

Submitted on 27 Jan 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Université Pierre et Marie Curie

ED515 : Complexité du vivant

*Département Endocrinologie, Métabolisme, Diabète / Equipe Immunologie des diabètes*

*Institut Cochin*

## **Implication du gène *Arntl2* lié au rythme circadien dans le diabète de type 1**

Par Basile Lebailly

Thèse de doctorat de Génétique

Dirigée par Ute C Rogner

Présentée et soutenue publiquement le 14 septembre 2015

Devant un jury composé de :

**Gorochov Guy**, PU. PH. H.U., Université Paris VI

Président du jury

**Rogner Ute**, DR2 CNRS

Directrice de thèse

**Challet Etienne**, DR CNRS, INCI Strasbourg

Rapporteur

**Gerard Matthieu**, PhD, Institut de biologie intégrative de la cellule

Rapporteur

**Amigorena Sebastian**, DR classe exceptionnelle CNRS, Institut Curie

Examineur

**Boitard Christian**, PU-PH

Examineur

**Julier Cécile**, DR1 Inserm, Université Paris VII

Examineur

**Pontoglio Marco**, DR1 CNRS, Institut Cochin

Examineur



Except where otherwise noted, this work is licensed under  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>



## Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Monsieur Etienne Challet et Monsieur Matthieu Gérard pour avoir consacré du temps à lire et à corriger ce manuscrit. Je suis également très reconnaissant envers Madame Cécile Julier, Monsieur Sébastien Amigorena, et Monsieur Marco Pontoglio d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinateur. Je remercie Monsieur Guy Gorochov d'avoir accepté de présider au jury.

Je tiens à remercier le CORRDIM et la FRM de m'avoir attribué des financements permettant la réalisation de cette thèse.

Je tiens particulièrement à remercier ma directrice de thèse, Ute Rogner, qui m'a énormément aidé tout au long de cette thèse, que ce soit scientifiquement ou humainement, prenant toujours le temps pour m'aider à chaque étape de mon travail, qui a toujours fait de son mieux pour m'offrir les meilleures conditions de travail et qui m'a beaucoup appris sur le métier de chercheur.

Je remercie également Monsieur Philip Avner et Monsieur Christian Boitard de leur soutien au sein de leurs laboratoires et des nombreuses discussions scientifiques. Je tiens à remercier Madame Agnès Lehuen et Monsieur Roberto Mallone de m'avoir accueilli au sein de leur unité à l'Institut Cochin. Merci aussi à Monsieur Shahragim Tajbakhsh de m'avoir permis de continuer mes travaux au sein de son département à l'Institut Pasteur durant la dernière année de ma thèse.

Je remercie Madame Mélanie Paces-Fessy, Monsieur Raphaël Scharfmann et Madame Hélène Strick-Marchand d'avoir participé à mon comité de thèse.

Je souhaite remercier toute l'équipe du laboratoire Génétique Moléculaire Murine de l'Institut Pasteur, particulièrement Chenxia He pour toute l'aide qu'elle m'a apporté dans mes débuts dans ce projet. Merci aussi à Julie Prudhomme pour son soutien moral et sa bonne humeur, ainsi qu'à Agnès Dubois, Céline Morey, Corinne Chureau, Corinne Veron, Edith Olivier, Jane Deuve, Mikaël Attia, Nisa Renault et Philippe Clerc de m'avoir accompagné pendant ces années.

Je remercie également toute l'équipe à l'Institut Cochin pour leur accueil chaleureux et leurs précieux conseils. Merci particulièrement à Chantal Bécourt pour avoir consacré beaucoup du temps à m'aider et à me perfectionner au maniement du cytomètre. Merci à Sandrine Luce qui m'a beaucoup aidé au quotidien du laboratoire, à François Lemonnier pour son expertise sans faille, à ma voisine de bureau Isabelle Tardivel, ainsi qu'à Sophie Guinoiseau et Camille Huet pour leur gentillesse.

Merci aussi à Pierre-Henri Commère pour son aide, et à Mathura Shanmugosundaram et Siham Yennek pour leur soutien, durant les analyses cytométriques. Merci également à l'équipe de l'animalerie Monod de leur professionnalisme.

Et un grand merci à mes parents et à ma sœur pour m'avoir supporté pendant cinq ans à parler de choses incompréhensibles.

## Table des matières

Abréviations .....	5
Index des illustrations.....	7
Avant-propos .....	9
Introduction .....	10
<b>I. Le diabète de type 1: une maladie auto-immune.....</b>	<b>11</b>
A. Les différentes formes de diabètes .....	11
B. Généralités sur le système immunitaire .....	14
1. Le système immunitaire inné .....	14
2. Le système immunitaire acquis .....	18
<b>II. Le développement des lymphocytes.....</b>	<b>28</b>
A. La maturation des lymphocytes.....	28
B. La tolérance immunitaire .....	32
1. La tolérance centrale .....	32
2. La tolérance périphérique.....	33
C. Equilibre dynamique du système immunitaire.....	34
D. La dérégulation du système immunitaire .....	35
E. Les cytokines.....	36
1. Généralités sur les cytokines .....	36
2. L'interleukine-21 .....	40
<b>III. L'auto-immunité : le cas du diabète de type 1.....</b>	<b>43</b>
A. Développement de la maladie .....	45
B. Symptômes .....	48
C. Diagnostic.....	48
D. Complications à long terme.....	49
E. Thérapies .....	50
<b>IV. Facteurs génétiques et environnementaux.....</b>	<b>52</b>
A. Facteurs génétiques .....	53
B. Facteurs environnementaux.....	58
<b>V. Etude du diabète de type 1 .....</b>	<b>61</b>
A. Modèle animal.....	61
1. La souris Non Obese Diabetic.....	61
2. Utilisation de lignées congéniques .....	65
3. Les lignées « knockout » .....	67
B. Le locus <i>Idd6</i> .....	70
C. Le gène <i>Arntl2</i> ( <i>Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2</i> ) .....	74
1. <i>Arntl2</i> : un candidat du diabète de type 1 .....	74

2. <i>Arntl2</i> , un gène de contrôle du rythme circadien .....	77
3. <i>Arntl2</i> : un facteur de protection face au diabète .....	89
Projet : Comprendre le rôle d' <i>Arntl2</i> dans le diabète de type 1 .....	92
Résultats .....	93
<b>I. Article 1 : Linking the circadian rhythm gene <i>Arntl2</i> to interleukin 21 expression in type 1 diabetes</b> .....	94
<b>II. Review: Circadian rhythm related genes: implication in autoimmunity and type 1 diabetes</b> .....	105
<b>III. Article 2 : The circadian gene <i>Arntl2</i> controls interleukin-21 expression, thymocyte apoptosis and diabetogenic activity in the NOD mouse</b> .....	116
Discussion .....	145
1. <i>Arntl2</i> diminue l'aspect diabétoène des lymphocytes .....	146
2. ARNTL2 diminue l'expression d' <i>Il-21</i> .....	149
3. <i>Arntl2</i> agit sur l'équilibre du système immunitaire.....	154
4. Le contrôle d' <i>Il-21</i> par ARNTL2 : une interaction directe .....	156
5. Rôle d' <i>Arntl2</i> dans le développement des lymphocytes T .....	157
6. <i>Arntl2</i> contrôle l'apoptose des thymocytes .....	159
7. Conclusion générale : <i>Arntl2</i> joue un rôle dans la régulation de l'équilibre immunitaire .....	164
Références bibliographiques .....	167
Résumé de la thèse .....	179

## Abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AHR: Aryl hydrocarbon Receptor

AR: Arthrite Rhumatoïde

ARN: Acide Ribo-Nucléique

ARNTL2: Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2

APC: Antigen Presenting Cell

BMAL1: Brain Muscle Arnt Like protein 1

BMAL2: Brain Muscle Arnt Like protein 2

CD: Cluster de Différenciation

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

DC : Dendritic Cell

DN : Double Négative (dans le thymus, cellules  $CD4^-CD8^-$ )

DP : Double Positive (dans le thymus, cellules  $CD4^+CD8^+$ )

DT1 : Diabète de Type 1

DT2 : Diabète de Type 2

ES cell : Embryonic Stem cell (cellule souche embryonnaire)

FoxP3: Forkhead bOX P3

GWAS: Genome Wide Association Study (étude d'association pangénomique)

HLA: Human Leukocyte Antigen

*Idd*: Insulin Dependant Diabetes

IDDM: Insulin Dependant Diabetes Mellitus

IFN $\gamma$  : Interféron gamma

IL: Interleukine

KO: KnockOut

LADA : Latent Autoimmune Diabetes of Adults (diabète auto-immun latent de l'adulte)

MODY: Maturity Onset Diabetes of the Young

NK: Natural Killer

TNK: Natural Killer T cell

NOD: NonObese Diabetic

NSC: Noyau SupraChiasmatique

PLN: Pancreatic Lymph Node (ganglions pancréatiques)

QTL : Quantitative Trait Loci (locus de caractères quantitatifs)

SNP: Single-Nucleotide Polymorphism (polymorphisme nucléotidique)

SP: Simple positive

TALEN: Transcription Activator-Like Effector Nucleases

TCR: T Cell Receptor

Teff: cellule T effectrice

TF: Transcription Factor

Treg: cellule T régulatrice



## Index des illustrations

Figure 1 : Mécanismes de défense du système immunitaire inné : .....	17
Figure 2 : Rôle des molécules du CMH .....	20
Figure 3 : Rôle des Lymphocytes T auxiliaires.....	24
Figure 4 : Origine et diversité des cellules immunitaires .....	26
Figure 5 : Modèle simplifié de la mise en place de la mémoire immunitaire .....	27
Figure 6 : Phases de maturation des lymphocytes dans le thymus.....	29
Figure 7 : Développement des lymphocytes dans le thymus .....	30
Figure 8 : Equilibre entre les fonctions effectrices et régulatrices du système immunitaire....	34
Figure 9 : Prolifération des lymphocytes T .....	35
Figure 10 : Actions pro et anti-inflammatoire des cytokines .....	39
Figure 11 : L'Interleukine-21 (IL-21) .....	40
Figure 12 : Voies de spécialisation des cellules naives.....	41
Figure 13 : Effet de l'IL-21 sur l'apoptose .....	42
Figure 14 : Les prédispositions génétiques au diabète de type 1 .....	44
Figure 15 : Modèle de l'initiation de la réaction auto-immune du diabète de type 1 .....	45
Figure 16 : Modélisation des différents types de reconnaissance antigéniques des cellules T	46
Figure 17 : Représentation des différentes phases successives d'un diabète de type 1 .....	47
Figure 18 : Architecture des maladies auto-immunes monogéniques et multigéniques .....	52
Figure 19 : Ratio de l'importance des gènes ou clusters de gènes sur la susceptibilité au diabète. ....	56
Figure 20 : Défauts de la tolérance centrale et périphérique potentiellement impliqués dans le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD .....	64
Figure 21 : Représentations simplifiées de la création de différents types de lignées d'étude de souris .....	66

Figure 22 : Incidence du diabète pour les différentes lignées étudiées .....	72
Figure 23 : Incidence de diabète lors d'un co-transfert de splénocytes .....	73
Figure 24 : Représentation de la région <i>Idd6</i> et des gènes présents .....	74
Figure 25 : Variation de l'expression, de l'épissage et polymorphismes d' <i>Arntl2</i> .....	75
Figure 26 : Résumé des différentes lignées de souris utilisées lors de nos tests:.....	76
Figure 27 : Relations entre l'horloge centrale et les horloges périphériques. ....	79
Figure 28 : La régulation des gènes liés à l'horloge circadienne .....	81
Figure 29 : Description fonctionnelle d'un facteur de transcription .....	82
Figure 30 : Représentation schématique de la protéine ARNTL2 .....	82
Figure 31 : Profil de transcription circadienne d' <i>Arntl2</i> , <i>Arntl1</i> , <i>Per1</i> , et <i>PAI-Id</i> .....	89
Figure 32 : Etude de l'effet d'une surexpression d'ARNTL2 sur l'activité diabétogène des splénocytes .....	90
Figure 33 : Etude de la diminution de l'expression d' <i>Arntl2</i> sur l'incidence de diabète.....	91
Figure 34 : Modèle de l'action d'ARNTL2 sur <i>Il-21</i> .....	157
Figure 35 : Effet de l'injection d'IL-21 sur l'apoptose thymique en fonction de la lignée étudiée .....	161
Figure 36 : Effet de l'injection d'IL-21 sur les proportions de différents types de cellules immunitaires.....	162
Figure 37 : Modèle de l'action d' <i>Arntl2</i> sur l'apoptose par son contrôle d'IL-21.....	163
Figure 38 : Résumé schématique de l'action d'ARNTL2 sur l'équilibre immunitaire et l'activité potentiellement diabétogène des lymphocytes T. ....	165

## **Avant-propos**

Le diabète de type 1 (DT1) représente 5 à 10% des 382 millions de cas de diabète estimés à l'échelle mondiale. On considère qu'il touche 0,25% de la population Française et son incidence ne cesse d'augmenter [1]. C'est une pathologie à vie qu'il est actuellement impossible de guérir. Il s'agit d'une maladie auto-immune qui résulte de la destruction des cellules pancréatiques productrices d'insuline par le système immunitaire du patient. Cette maladie est complexe et résulte de facteurs génétiques et environnementaux.

On peut traiter les symptômes en subvenant aux besoins d'insuline régulièrement par des injections pour rétablir le taux de glucose mais il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode permettant de remédier durablement à ce manque [2]. De façon générale, les recherches portent actuellement à rétablir la production d'insuline que ce soit en développant des méthodes de transplantation des cellules d'îlots ou de pancréas complet [3] mais également en utilisant des cellules souches afin de relancer leur différenciation en cellules bêta [4].

A l'heure actuelle les facteurs environnementaux et génétiques déclencheurs de la maladie ne sont pas encore tous connus. Des techniques pour étudier le DT1 se développent, notamment grâce aux modèles animaux comme la souris. En effet, l'utilisation d'animaux permettant un contrôle permanent de l'environnement il est possible de se concentrer sur la part génétique de la maladie et les lignées génétiquement connues de souris permettent de trouver des variations génétiques prédisposant potentiellement à la maladie. C'est dans ce contexte que s'insère notre projet, nous cherchons à identifier et caractériser des gènes de prédisposition au diabète de type 1 grâce à des lignées de souris présentant des variations génétiques minimales mais avec des prédispositions différentes au diabète de type 1.

# Introduction

## **I. Le diabète de type 1: une maladie auto-immune**

### **A. Les différentes formes de diabète**

Le terme diabète sucré regroupe des maladies hétérogènes aux niveaux génétiques et cliniques, l'hyperglycémie étant leur symptôme commun. L'origine pancréatique du diabète sucré fut révélée par l'induction du diabète chez le chien après une pancréatectomie en 1889 par Oskar Minkowski et Josef Von Mering. Gustave Edouard Laguesse en 1883 et Bernhard Naunyn en 1898 proposèrent comme cause de la maladie une défaillance de la fonction sécrétoire des îlots pancréatiques décrits par Paul Langerhans en 1869. Enfin la découverte de l'insuline en 1921 par Frederick Grant Banting et Charles Herbert Best permit d'avancer dans la compréhension du diabète.

Le diabète est une maladie qui entraîne un dysfonctionnement du système de régulation de la glycémie par le manque ou l'inefficacité de l'insuline, hormone produite par les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans. Le rôle de l'insuline consiste à diminuer le taux de glucose dans le sang en entraînant la translocation de GLUT-4 (Glucose transporter type 4), un transporteur de glucose à la membrane des cellules. Sans insuline le glucose s'accumule dans le sang ce qui peut entraîner de graves complications sur le long terme, telles que des maladies cardiaques ou des dommages rénaux ou oculaires. Les principaux symptômes du diabète sont la polyurie, la polydipsie et une perte de poids. Dans la plupart des cas, le diabète est une maladie polygénique et multifactorielle, ce qui signifie qu'elle est due à la fois à des paramètres génétiques et environnementaux.

Il existe plusieurs formes de diabètes plus ou moins courantes parmi lesquelles :

Le diabète de type 2, aussi appelé diabète non-insulinodépendant, est une forme insulino-résistante de diabète, l'insuline est produite mais les cellules de l'organisme capables de

capter le glucose sous sa dépendance sont devenues insensibles à son effet. Il survient souvent autour de la cinquantaine chez des personnes en surpoids, car, même si l'âge, le sexe et les prédispositions génétiques ont une forte influence sur les risques de développer cette maladie, ce sont surtout des facteurs sociaux et environnementaux, souvent liés à nos modes de vie, qui expliquent l'accroissement constant de la prévalence de cette maladie : surpoids, obésité, manque d'activité physique et sédentarité constituent les principales causes du diabète en France. Il compte pour environ 90 % des diabètes, et bien sûr, le vieillissement de la population, le dépistage précoce et l'amélioration de l'espérance de vie des personnes traitées pour diabète augmentent mécaniquement les chiffres. Il est traité par un régime alimentaire approprié et, si nécessaire, par des médicaments pris par voie orale.

Le diabète de type 1 est, la plupart du temps, diagnostiqué chez les enfants ou les adolescents, il est dû à la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans par le système immunitaire ce qui entraîne un arrêt de la production d'insuline, d'où sa qualification de diabète insulino-dépendant [5]. Il est à noter que cette destruction est progressive et la maladie ne devient apparente que tardivement, après que 80 à 90 % des cellules pancréatiques productrices d'insuline aient déjà été détruites [6]. Cependant il existe d'autres formes de diabète moins courantes :

Le diabète gestationnel : il touche des femmes sans antécédents de diabète, ces patientes commencent à présenter des taux de glucose élevés durant leur grossesse, particulièrement durant le troisième trimestre. Cette forme de diabète est causée par un dysfonctionnement des récepteurs à insuline, cela est dû à des facteurs liés à la grossesse tels que la présence de l'hormone lactogène placentaire humaine qui interfère avec les récepteurs à insuline.

Le diabète auto-immun latent de l'adulte (Latent autoimmune diabetes of adults : LADA) est une variante tardive de diabète de type 1 apparaissant chez l'adulte, le diabète de type 1 étant normalement diagnostiqué chez l'enfant, le plus souvent avec une évolution plus lente. Les

adultes souffrant de cette forme de diabète sont souvent initialement faussement diagnostiqués pour un diabète de type 2, apparaissant chez l'adulte, particulièrement si ils ont des facteurs de risques pour ce type de diabète comme l'obésité ou d'autres cas connus dans la famille. Il peut être traité oralement, comme un diabète de type 2, dans un premier temps mais il est généralement nécessaire de compléter par un traitement d'insuline et un contrôle suivi au fur et à mesure de son évolution.

Enfin, le diabète monogénique (Maturity Onset Diabetes of the Young: MODY) est un terme général pour toutes les formes de diabète causées par une ou plusieurs mutations dans un gène autosomal dominant provoquant une perturbation de la production d'insuline résultant en un diabète.

Dans le cadre de notre étude nous nous sommes concentrés sur le diabète de type 1.

Dans le cadre d'une étude réalisée sur une maladie auto-immune comme le diabète de type 1, c'est-à-dire dans un contexte où les mécanismes de défense d'un organisme s'attaquent à lui-même, il semble important de se pencher particulièrement sur le système immunitaire. Les mécanismes mis en place dans le cadre d'une maladie auto-immune étant les mêmes que ceux utilisés par un organisme pour se défendre lui-même contre des éléments extérieurs.

## B. Généralités sur le système immunitaire

Le système immunitaire varie selon l'espèce étudiée, mais de façon générale le système immunitaire d'un mammifère est un système biologique constitué d'un ensemble coordonné d'éléments de reconnaissance et de défense qui discrimine le « soi » du « non-soi », son objectif est de protéger et faciliter la survie de l'individu et de l'espèce dans un environnement hostile. Pour cela il faut empêcher le non-soi de pénétrer dans l'organisme, et, si cela échoue, détruire ce qui est reconnu comme non-soi, comme les pathogènes : virus, bactéries, parasites, certaines particules ou molécules « étrangères » dont certains poisons.

Il existe deux niveaux de protection, les systèmes immunitaires inné et acquis.

### 1. Le système immunitaire inné

Les micro-organismes et toxines cherchant à pénétrer dans un organisme sont tout d'abord confrontés aux mécanismes et cellules du système immunitaire inné. Celui-ci se met en place quand des microbes sont identifiés par des récepteurs de reconnaissance de motifs, capables de reconnaître les composants conservés par de larges groupes de micro-organismes [7] ou quand des cellules endommagées ou stressées envoient des signaux d'alarme. Les défenses immunitaires innées ne sont pas spécifiques [8], ce qui signifie que ces systèmes répondent aux pathogènes de façon générique. Ce type de protection ne confère pas d'immunité à long terme contre un pathogène rencontré, contrairement au système immunitaire acquis. Le système immunitaire inné est le système dominant dans la plupart des organismes [9].



a) Les barrières de surface

La première ligne de défense de l'organisme se situe à la périphérie et dans les zones d'échanges avec l'extérieur, c'est là qu'agissent les barrières de surface comme la peau ou les muqueuses, empêchant les pathogènes de pénétrer dans l'organisme, mais aussi les phénomènes de toux et d'éternuements permettant d'évacuer ce qui aurait déjà pénétré dans le système respiratoire ainsi que les larmes et le mucus permettant de nettoyer les zones à risques. Parmi ces barrières se distinguent également les barrières chimiques comme l'acidité de l'estomac ou certaines enzymes présentes pour éliminer les pathogènes, notamment au niveau du système digestif (**Figure 1 a**).

b) L'inflammation

Parmi les premiers mécanismes de défense on trouve également les phénomènes d'inflammation [10]. Les symptômes de l'inflammation sont: la rougeur, la chaleur et la douleur, qui sont causées par une augmentation du flux sanguin dans les tissus. L'inflammation est causée par les eicosanoïdes et les cytokines qui sont relâchés par les cellules endommagées ou infectées. Ces composés participent également à recruter les cellules immunitaires au niveau du site d'infection ainsi qu'à promouvoir la guérison des tissus endommagés une fois les pathogènes supprimés (**Figure 1 b**).

c) Le système du complément

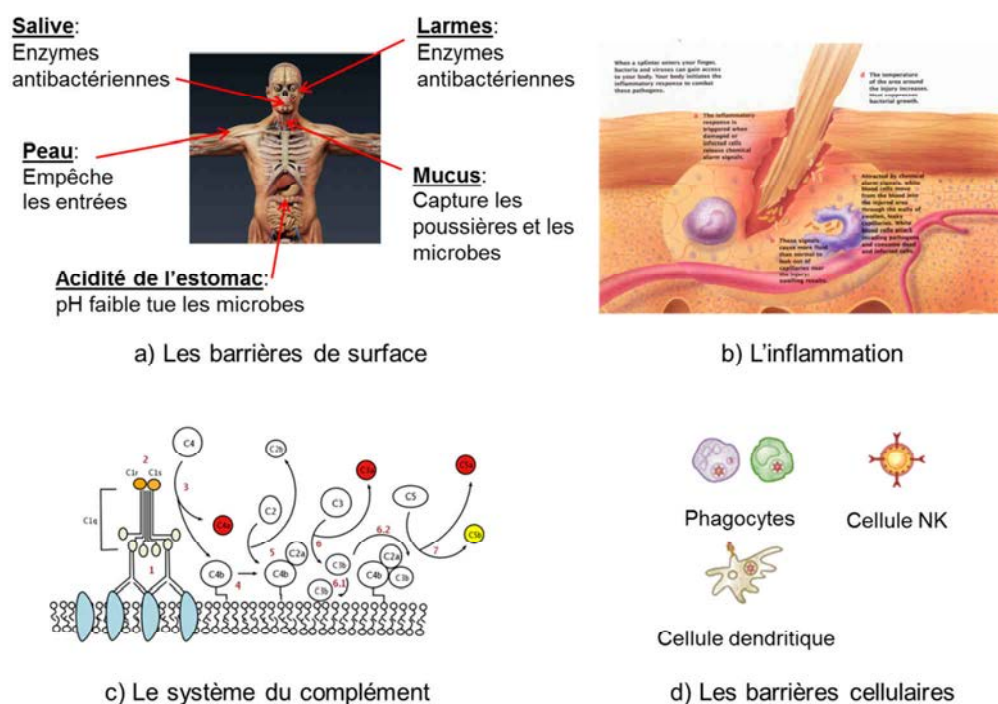
Par la suite, on peut observer l'action du système du complément, un ensemble d'une vingtaine de protéines complétant l'action des anticorps. Ce mécanisme présent chez les vertébrés, est déclenché quand un anticorps de l'organisme rencontre et se lie sur un antigène. Cette liaison va activer par l'intermédiaire de sous unités catalytique la synthèse de la C3 convertase [11]. Cette molécule est responsable non seulement du renforcement de la liaison

du complexe à la membrane des microbes, mais aussi de l'initiation du phénomène d'inflammation et d'une cascade protéolytique qui amplifie le signal initial par un feedback positif. Ce mécanisme entraîne également la production de peptides qui attirent les cellules immunitaires en plus de marquer les cellules infectieuses pour faciliter leur destruction (**Figure 1 c**).

#### d) Les barrières cellulaires

Les acteurs des barrières cellulaires, les leucocytes (globules blancs) agissent de façon indépendante, comme des organismes unicellulaires, parmi eux on trouve : les phagocytes (macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques), les mastocytes, les éosinophiles, les basophiles et les cellules natural killer. Ces cellules identifient et éliminent les pathogènes, soit en attaquant des pathogènes plus gros qu'eux par contact, soit en engloutissant puis tuant les micro-organismes [12]. La phagocytose est une composante importante de l'immunité innée réalisée par les phagocytes, qui engloutissent les pathogènes ou les particules. Les phagocytes patrouillent généralement le corps à la recherche de pathogènes mais peuvent également être attirés vers une destination spécifique par les cytokines. Une fois qu'un pathogène a été absorbé par un phagocyte, il est pris au piège dans une vésicule intracellulaire : le phagosome, qui fusionne par la suite avec une autre vésicule : le lysosome pour former un phagolysosome. Les neutrophiles et les macrophages se déplacent dans le corps à la recherche de pathogènes, les neutrophiles sont normalement trouvés dans le sang et sont les phagocytes les plus abondants, représentant 50 à 60% des leucocytes totaux. Durant la phase d'inflammation, particulièrement lors d'une infection bactérienne, les neutrophiles migrent vers le site d'inflammation et sont généralement les premières cellules à arriver sur place. Les cellules dendritiques (DC) sont des phagocytes agissant dans les tissus au contact avec l'environnement extérieur, notamment au niveau de la peau, du nez, des poumons, de

l'estomac et des intestins [13]. Les cellules dendritiques servent de lien entre les systèmes innés et acquis en signalant les antigènes aux cellules T. Les mastocytes régulent la réponse inflammatoire [14], ils sont le plus souvent associés aux phénomènes d'allergie et d'anaphylaxie. Les basophiles et éosinophiles sont de la famille des neutrophiles, ils sécrètent des médiateurs chimiques qui sont impliqués dans la défense contre les parasites et jouent un rôle dans les réactions allergiques comme l'asthme (**Figure 1 d**).



**Figure 1 :** Mécanismes de défense du système immunitaire inné : a) Les principales barrières de surface et leurs modes d'action, b) mode d'action du phénomène d'inflammation, c) mode d'action des protéines du complément, d) principaux types de cellules impliquées dans les barrières cellulaires.

## 2. Le système immunitaire acquis

Le système immunitaire acquis permet une réponse immunitaire plus forte et plus ciblée (adaptative) ainsi qu'une mémoire immunologique, dans laquelle chaque pathogène rencontré est mémorisé par un antigène signature [15]. La réponse immunitaire adaptative est spécifique de l'antigène et nécessite la reconnaissance spécifique d'un antigène du non-soi par le processus de présentation de l'antigène. La spécificité de l'antigène permet la mise en place d'une réponse adaptée à un pathogène ou une cellule infectée par un pathogène spécifique. La capacité à mettre en place ces réponses adaptées est maintenue par des cellules mémoires. Si un pathogène vient à infecter le même organisme plus d'une fois, ces cellules mémoires spécifiques sont utilisées pour l'éliminer rapidement (c'est ce mécanisme qui est mis en œuvre lors de la vaccination).

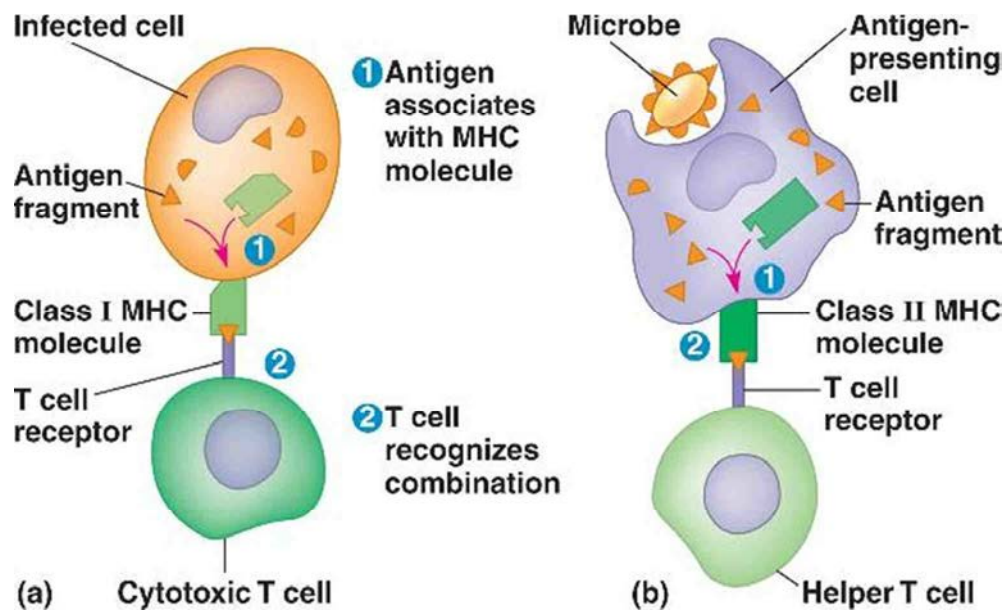
Les cellules du système immunitaire acquis sont des leucocytes spéciaux, appelés lymphocytes. Les cellules B et T sont les lymphocytes majeurs, les cellules B sont impliquées dans la réponse humorale tandis que les cellules T sont impliquées dans la réponse immunitaire cellulaire. Ces deux types de cellules portent des récepteurs de surface qui reconnaissent des cibles spécifiques. Les cellules T reconnaissent le non soi comme un pathogène seulement après qu'un antigène, par exemple un fragment du pathogène, ait été reconnu par combinaison avec un récepteur du soi du complexe majeur d'histocompatibilité.

Au contraire, le récepteur antigène spécifique des cellules B est une molécule anticorps à la surface des cellules B qui reconnaît l'ensemble des pathogènes sans avoir besoin d'une reconnaissance de l'antigène. L'ensemble des antigènes des récepteurs des cellules B représentent tous les anticorps que le corps peut produire [16]. Le fonctionnement de ces cellules est donc fortement lié, et dépendant, du complexe majeur d'histocompatibilité.

a) Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le complexe majeur d'histocompatibilité est, en immunologie, un système de reconnaissance du soi. Les molécules du CMH sont situées à la surface des cellules présentatrices de l'antigène qui assurent la présentation de l'antigène aux lymphocytes T afin de les activer. On distingue les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I et de classe II [17]. Génétiquement, c'est un ensemble complexe de gènes, englobant le système HLA (Human Leukocyte Antigen), qui ne peut être identique chez deux individus, sauf pour les vrais jumeaux, étant donné le nombre d'allèles et de configurations possibles. En effet, la plupart de ces gènes sont très polymorphiques et chaque allèle s'exprime en co-dominance, ce qui permet à chaque individu de disposer d'une très grande variété de configurations, ce qui augmente les chances de reconnaître un marqueur étranger.

Au niveau moléculaire, cette information génétique est exprimée notamment en protéines de surface. Les molécules de CMH I sont présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme, à l'exception des neurones et de certains tissus comme la cornée ou les glandes salivaires. Elles présentent l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques (T CD8) et servent avec les molécules de classe I non classiques de marqueur du soi, c'est-à-dire les cellules faisant partie de l'organisme, pour les lymphocytes Natural Killer. Le CMH II permet à certains globules blancs, comme les macrophages ou les cellules dendritiques, de présenter des parties des corps intrus pour déclencher une réponse immunitaire, cette fois ci par l'intermédiaire des lymphocytes T CD4 (**Figure 2**).



**Figure 2 :** Le rôle des molécules du CMH a) le CMH de classe I présent sur l'ensemble des cellules de l'organisme permet aux cellules T cytotoxiques de reconnaître une cellule infectée, b) le CMH de classe II présent sur les cellules présentatrices d'antigène leur permet d'activer les cellules T auxiliaire spécifiquement contre un antigène donné.

Ces complexes participent aux réponses immunitaires, c'est la clef de l'immunité cellulaire et de la communication entre les cellules qui travaillent à la protection de l'organisme contre des agressions d'organismes pathogènes. Dans de rares cas, les peptides du CMH peuvent devenir à leurs tours responsables de maladies auto-immunes indépendamment de l'immunité cellulaire.

#### b) Les cellules présentatrices d'antigènes

Les cellules présentatrices d'antigène (APC) sont des cellules portant un antigène étranger couplé à leur CMH à leur surface, ce processus est appelé la présentation d'antigène. Les cellules T ne peuvent pas reconnaître et interagir avec un antigène « libre », elles ne peuvent identifier un antigène par leur TCR (T Cell Receptor) que si celui-ci leur est présenté par une autre cellule, par exemple via son CMH [18]. Ces cellules présentatrices d'antigène expriment

en général les molécules des CMH I et II et peuvent stimuler les cellules T auxiliaires (Helper) et T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (**Figure 2**).

Les APCs sont très efficaces pour internaliser les antigènes, soit par phagocytose ou par une endocytose liée aux récepteurs, puis présentent un fragment de l'antigène, accroché à leur CMH à la surface de leur membrane. Les lymphocytes T reconnaissent et interagissent avec les molécules du MHC liées à l'antigène à la surface des APCs. Un signal de co-stimulation additionnel est alors produit par l'APC, entraînant l'activation de la cellule T.

Il y a trois grandes catégories de cellules présentatrices d'antigènes : les plus importantes sont les cellules dendritiques, ayant la plus grande variété de présentation d'antigène, mais on trouve également des macrophages et certains types très spécifiques de lymphocytes B.

- Les lymphocytes B

Une cellule B identifie un pathogène quand l'anticorps à sa surface se lie à un antigène étranger spécifique [19]. Ce complexe antigène / anticorps attire une cellule T auxiliaire correspondante qui relâche des lymphokines et active la cellule B [20]. Tandis que la cellule B activée commence à se diviser, sa descendance secrète des millions de copies de l'anticorps ayant reconnu cet antigène. Ces anticorps circulent dans le plasma sanguin et la lymphe, se lient aux pathogènes exprimant l'antigène cible et le marquent pour être détruit par les phagocytes. Les anticorps peuvent aussi neutraliser les dangers directement ; en se liant aux toxines bactériennes ou en interférant avec les récepteurs que les virus et les bactéries utilisent pour infecter les cellules [21].

- Les lymphocytes T

- Lymphocytes T cytotoxiques

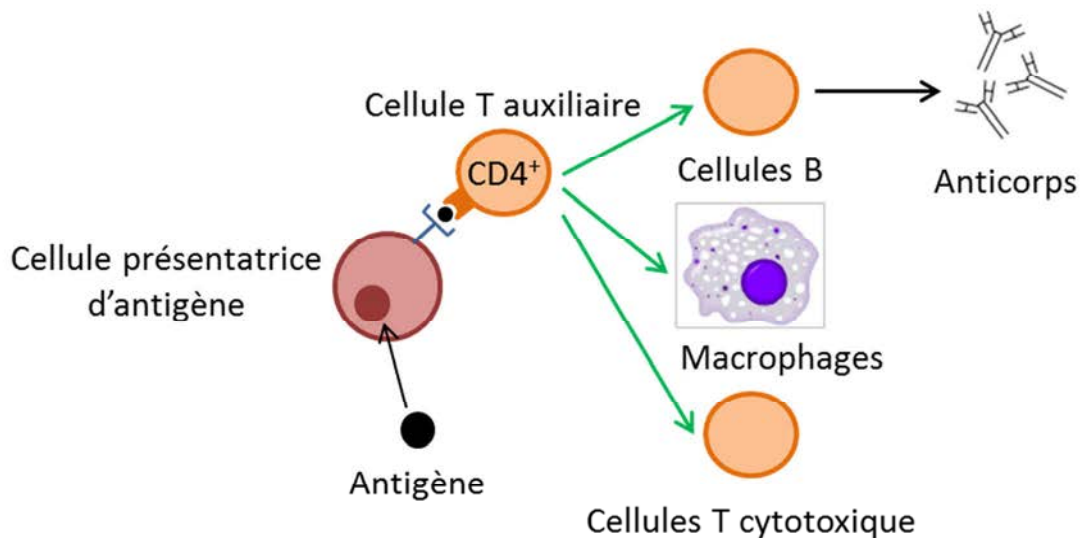
Les cellules T cytotoxiques sont un sous-groupe des cellules T qui tuent les cellules infectées par des virus (et autres pathogènes), ou endommagées ou non-fonctionnelles [22]. Comme pour les cellules B, chaque type de cellule T reconnaît un antigène différent, les cellules T cytotoxiques sont activées quand leur récepteur de cellule T (TCR) se lie à son antigène spécifique dans un complexe avec le récepteur du MHC de classe I d'une autre cellule. La reconnaissance de ce complexe MHC/antigène est aidée par un corécepteur CD8. La cellule T se déplace ensuite à travers le corps à la recherche de cellules portant le récepteur MHC I correspondant à cet antigène. Quand une cellule T activée entre en contact avec une de ces cellules, elle relâche des cytokines telles que la perforine, qui crée des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible, permettant aux ions, à l'eau et aux toxines de rentrer. L'entrée d'une autre toxine appelée granulysin, une protéase, entraîne l'apoptose de la cellule cible [23]. Le rôle des cellules T dans l'élimination des cellules hôtes est particulièrement important dans la prévention de la réplication des virus. L'activation des cellules T est très strictement contrôlée et nécessite généralement un signal d'activation MHC/antigène très fort ou un signal d'activation additionnel fourni par les cellules T auxiliaires.

- Lymphocytes T auxiliaires

Les cellules T auxiliaires régulent à la fois les réponses immunitaires innées et acquises, ces cellules n'ont pas d'activité cytotoxique et n'éliminent pas les cellules infectées ou les pathogènes directement. Elles contrôlent la réponse immunitaire en dirigeant d'autres cellules et aident, par leur action sur les autres types de cellules immunitaires, à adapter la réponse à un pathogène particulier [24]. Leurs actions incluent la maturation des cellules B en cellules



plasmatisques et cellules B mémoires et l'activation des cellules T cytotoxiques et des macrophages [25]. Les cellules T auxiliaires portent à leur surface le TCR qui reconnaît les molécules porteuses d'antigènes liées au MHC de classe II. Le complexe MHC / antigène est aussi reconnu par le corécepteur CD4, une glycoprotéine exprimée à la surface de ces cellules, qui recrute et permet l'entrée des molécules dans les cellules T responsables de leur activation. L'association des cellules T auxiliaires avec le complexe MHC / antigène est plus faible que celle des cellules T cytotoxiques, ce qui signifie que beaucoup de récepteurs (200 à 300) des T auxiliaires doivent être attachés à un complexe MHC / antigène afin d'activer la cellule auxiliaire, tandis que les cellules T cytotoxiques peuvent être activées par la liaison d'une seule molécule. Les T auxiliaires nécessitent également un contact plus long avec une cellule présentatrice d'antigène [26]. Quand elles sont activées, les cellules T auxiliaires se divisent rapidement et relâchent des cytokines, des messagers cellulaires du système immunitaire, qui influencent l'activité de nombreux autres types de cellules. Les cytokines signalées, produites par les lymphocytes T auxiliaires augmentent, par exemple, la fonction microbicide des macrophages et l'activité des cellules T cytotoxiques [27]. De plus, l'activation des T auxiliaires entraîne une augmentation de l'expression des molécules exprimées à la surface des cellules T, telles que le ligand CD40, qui entraîne des signaux de stimulation requis pour activer la production d'anticorps des cellules B [28] (**Figure 3**). Ces cellules T auxiliaires augmentant la réponse immunitaire sont appelées cellules T effectrices.



**Figure 3 :** Rôle des Lymphocytes T auxiliaires: Les cellules présentatrices d'antigène (APCs) portent des antigènes sur leur MHC de classe II. Les cellules T auxiliaires les reconnaissent, à l'aide de co-recepteur CD4. L'activation d'une cellule T auxiliaire au repos entraîne son relachage de cytokines et autres signaux de stimulation (flèches vertes) qui stimulent l'activité des macrophages, cellules T cytotoxiques et cellules B, ces dernières produisant des anticorps. La stimulation des cellules B et des macrophages entraîne une prolifération des cellules T auxiliaires.

Ces cellules peuvent se différencier en plusieurs sous-catégories telles que les Th1, Th2, Th3, Th17, Th9, ou TFH qui sécrètent différentes cytokines pour faciliter différents types de réponses immunitaires. La signalisation des APC dirige les cellules T vers des sous-catégories différentes [29].

#### ➤ Les lymphocytes T régulateurs

Au sein des cellules auxiliaires on trouve une catégorie spéciale de cellules, les cellules T régulatrices (Treg). Ces cellules, anciennement appelées cellules T suppresseurs, sont indispensables pour le maintien de la tolérance immunitaire. Leur rôle majeur est de stopper les processus immunitaires mis en place par les cellules T à la fin d'une réaction immunitaire et de supprimer les cellules T auto-réactives qui échappent au processus de sélection négative dans le thymus (voir partie II : Le développement des lymphocytes).

Il existe deux types de cellules T CD4<sup>+</sup> régulatrices : les cellules naturelles et adaptatives.

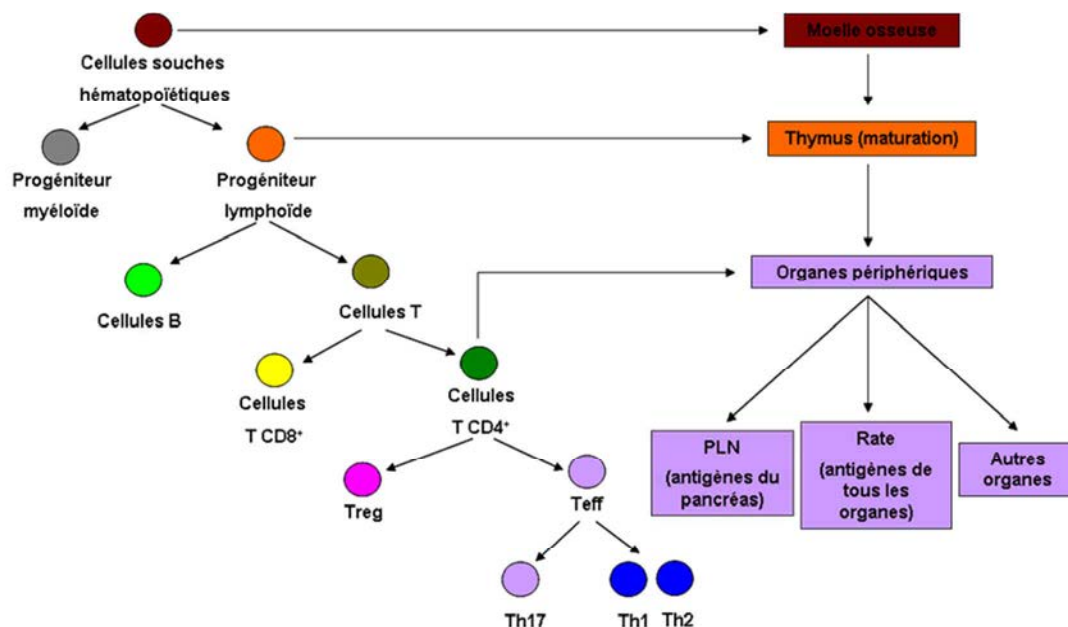
Les cellules Treg naturelles (aussi connues comme CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> ou plus simplement nTreg) sont développées dans le thymus et sont liées aux interactions entre les cellules T en cours de développement avec à la fois les cellules dendritiques myéloïdes (CD11c<sup>+</sup>) et plasmacytoïdes (CD123<sup>+</sup>) qui ont été activées par la TSLP (Thymic Stromal Lymphopoietin), un messager chimique stimulé durant l'inflammation [30]. Elles représentent 5 à 10% des cellules T CD4<sup>+</sup> périphériques et peuvent être distinguées des autres types de cellules T par la présence de la molécule intracellulaire FoxP3. Au cours de la sélection des lymphocytes dans le thymus, les nTreg vont influencer l'engagement des cellules T vers la voie nTreg sans pour autant être absolument indispensables [31]. In vitro, les nTreg inhibent la prolifération et la sécrétion de cytokines par les cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ou CD8<sup>+</sup>, notamment des cellules T effectrices, de manière contact-dépendantes [32]. Ces cellules semblent être capables de reconnaître un répertoire étendu d'antigènes du soi et du non-soi incluant des antigènes de pathogènes [33], mais le répertoire de leur TCR semble biaisé vers la reconnaissance des cellules du soi [34].

Les cellules T régulatrices adaptatives (aTreg) peuvent être générées à partir de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> périphériques. Au contraire des nTreg dont on pense qu'elles régulent la réaction auto-immune dès son initiation, les cellules aTreg jouent un rôle dans le contrôle des maladies auto-immunes en aval. Ces aTreg sont classées en deux catégories qui dépendent de leur mode de génération et d'action : les cellules Tr1 ou Th3 [35]. Ces deux types cellulaires sont d'anciennes cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> ; les Tr1, activées en présence d'IL-10, se mettent elles aussi à produire cette interleukine, tandis que les Th3, suite à une adjonction de TGF-β et d'IL-2, se mettent à produire FoxP3.

Les cellules aTreg Tr1 et Th3 sont impliquées dans le contrôle tardif des réponses auto-immunes notamment par le contrôle de l'homéostasie des cellules T effectrices par des

mécanismes dépendant de la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Suite à l'exposition inattendue de l'organisme à un antigène exogène ou à une inflammation, les cellules nTreg peuvent se différencier en cellules aTreg ou promouvoir leur développement à partir d'un pool de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> [36].

Il est à noter que tous ces lymphocytes dérivent du même progéniteur lymphoïde, leur différenciation au cours de leur développement est due à de nombreux paramètres et cela affecte énormément la capacité ainsi que l'ampleur de la réponse immunitaire (**Figure 4**).



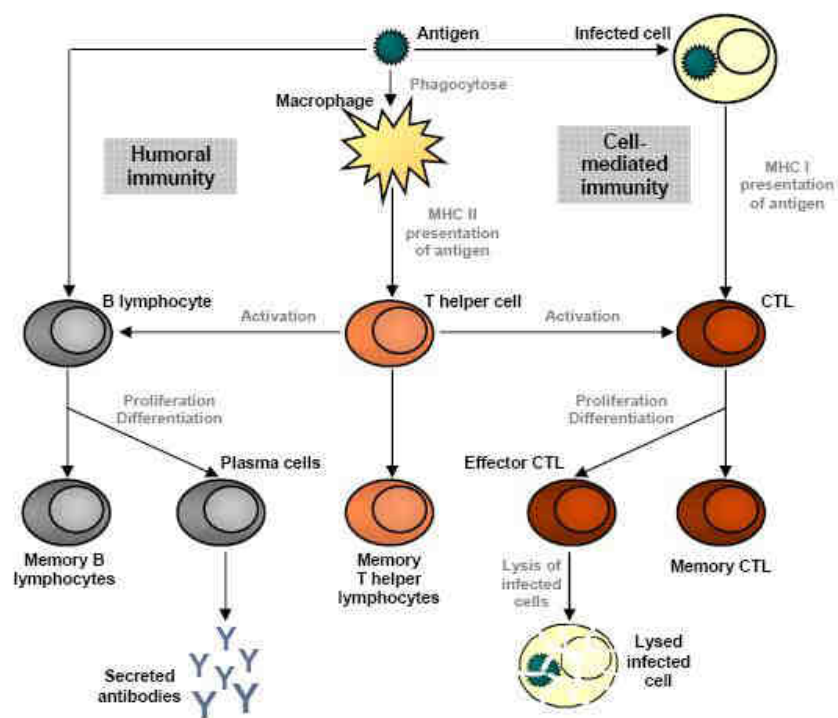
**Figure 4 :** Origine et diversité des cellules immunitaires. Un seul type de cellules souches est capable de se différencier en une grande quantité de cellules très spécialisées responsables du fonctionnement du système immunitaire.

Ces cellules dérivent toutes d'un seul type de cellule d'origine, néanmoins leurs rôles une fois leur spécialisation terminée sont très différents, voire opposés. Certaines agissent de façon effectrice, et se focalisent sur la destruction du non-soi, d'autres de façon régulatrices, et contrôlent l'action générale du système immunitaire. Le déséquilibre entre ces fonctions effectrices et régulatrices du système immunitaire peut entraîner des maladies comme les cancers [37] ou l'auto-immunité [38]. Les lymphocytes T jouent un rôle majeur dans cet

équilibre. Ils sont fabriqués dans la moelle osseuse et migrent dans le thymus pour leur maturation avant d'être activés pour rejoindre la circulation.

### c) La mémoire immunitaire

Quand les cellules B et T sont activées et commencent à proliférer, une partie de leur descendance deviennent des cellules mémoires à long terme. Tout au long de la vie de leur organisme, ces cellules mémoires se souviendront d'un pathogène spécifique rencontré et permettront de mettre en place une réponse très forte si le même pathogène est détecté à nouveau. Ce mécanisme est adaptatif car il apparaît au cours de la vie d'un individu comme une adaptation à une infection de manière à mieux résister en cas de nouvelle contamination et est à la base des techniques de vaccination (**Figure 5**) [39].



**Figure 5 :** Modèle simplifié de la mise en place de la mémoire immunitaire MHC – major histocompatibility complex, CTL – cytotoxic T lymphocytes

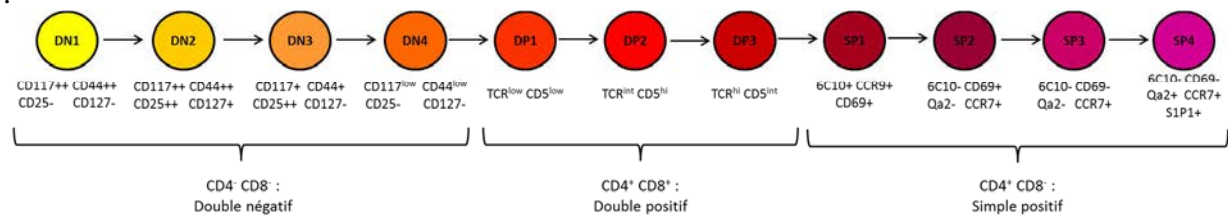
## II. Le développement des lymphocytes

### A. La maturation des lymphocytes

Chez les mammifères, les cellules souches hématopoïétiques se différencient dans la moelle osseuse afin de former les différents types de cellules présentes dans le corps [40]. Ce processus est appelé hématopoïèse. Tous les lymphocytes sont créés par ce processus à partir d'un type de progéniteur lymphoïde commun avant d'être différenciés en un type de lymphocyte. La formation des lymphocytes est appelée lymphopoïèse, au cours de ce processus les cellules T migrent dans le thymus afin de maturer. Au cours de cette maturation, ces cellules passent par de nombreuses étapes pouvant être caractérisées par les marqueurs exprimés à leur surface.

Les techniques modernes de marquages grâce à des anticorps reconnaissant des cibles spécifiques sur les lymphocytes permettent de suivre de façon très précise ces cellules car ces marqueurs membranaires changent au fur et à mesure au cours de leur développement. Ces marquages très spécifiques permettent de séparer les lymphocytes doubles négatifs  $CD4^-CD8^-$  en 4 stades différents, les doubles positifs  $CD4^+CD8^+$  en 3 stades différents et les simples positifs  $CD4^+$  en 4 stades différents [41].

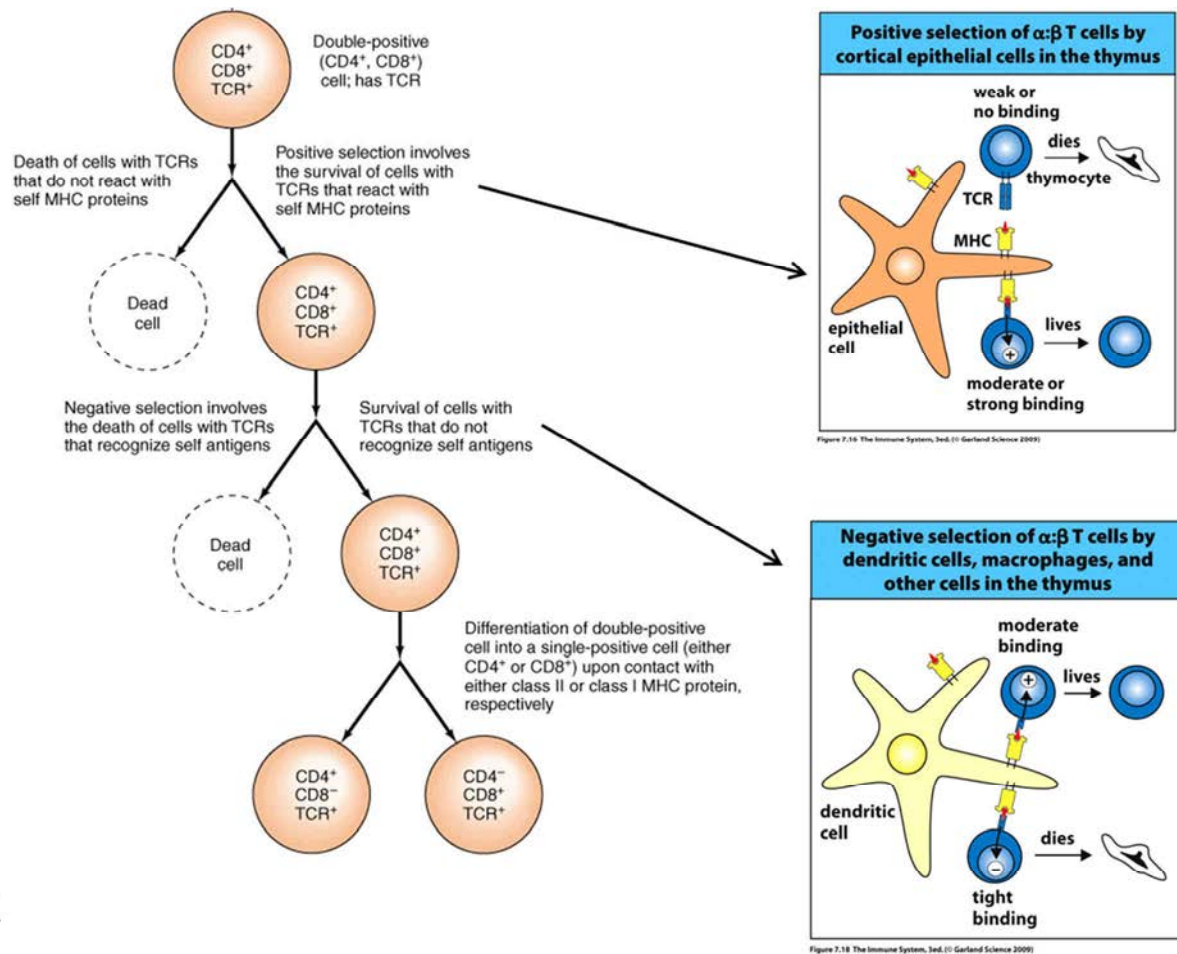
Cette capacité de différencier les stades de maturation des lymphocytes couplé à des tests tels que la prolifération, l'apoptose et l'expression de diverses cytokines permet de détecter des différences sur des populations très peu représentées mais pouvant entraîner des bouleversements majeurs sur l'ensemble du système immunitaire (**Figure 6**).



**Figure 6 :** Phases de maturation des lymphocytes dans le thymus et marqueurs cellulaires pouvant être utilisés pour les caractériser.

Ces marqueurs, pour la plupart appelés CD (Cluster de Différenciation) sont retrouvés même bien après la spécialisation des lymphocytes et permettent de séparer ces cellules en fonction de leur rôle, par exemple les marqueurs CD3, CD4 ou CD8 sont associés aux cellules effectrices.

Cela permet notamment de suivre les mécanismes de sélection ayant lieu dans le thymus servant à éliminer les cellules dérégulées afin d'éviter qu'elles soient libérées dans l'organisme. Au cours de la maturation dans le thymus ces cellules vont subir deux types de sélections complémentaires (**Figure 7**).



**Figure 7 :** Développement des lymphocytes dans le thymus par une double sélection afin de sélectionner les cellules actives mais non auto-réactives.

La première sélection, dite sélection positive, teste la reconnaissance des lymphocytes avec des antigènes peptidiques du non-soi. Au cours de cette sélection les lymphocytes sont mis en contact avec des cellules épithéliales du cortex thymique afin de tester leur capacité de liaison, les lymphocytes incapables de se lier ou se liant trop faiblement seront éliminés. Cette capacité déterminera la classe du complexe majeur d'histocompatibilité à laquelle ils appartiendront et donc leur rôle et les marqueurs à la surface de leur membrane [42].

La seconde sélection, dite sélection négative, teste la liaison de peptides issus du soi. Les lymphocytes sont mis en contact avec des cellules du soi tels que des cellules dendritiques ou



des macrophages, si les cellules T reconnaissent fortement le peptide du soi, elles reçoivent un signal apoptotique et meurent.

Lors de la sélection négative, si l'interaction est faible, les cellules T vont survivre et devenir effectrices (Teff). Si l'interaction est intermédiaire, elles deviendront régulatrices (Treg). Du fait de cette sélection drastique, seulement 5% des thymocytes produits migrent en périphérie [43] [44]. Cette étape est particulièrement intéressante dans les études sur les maladies auto-immunes car les cellules éliminées à ce stade le sont à cause de leur caractère potentiellement auto-immun.

Cependant d'autres facteurs rentrent en ligne de compte au cours de ces sélections, les cellules peuvent en effet recevoir des signaux pro ou anti-apoptotique agissant sur leur survie, on a notamment constaté que l'interleukine-21 agissait comme un signal de récupération face à l'apoptose [45].

Après cette étape les lymphocytes T ont encore à subir une différenciation après exposition à un antigène, ils peuvent devenir des lymphocytes effecteurs ou mémoires. Le rôle des lymphocytes effecteurs est d'éliminer les antigènes, soit grâce à des granules cytotoxiques (cellules T cytotoxiques), ou bien en les signalant à d'autres cellules du système immunitaire (cellules T auxiliaire). Les cellules T mémoires restent dans les tissus périphériques et dans la circulation pendant une période prolongée prêtes à répondre à l'antigène auquel elles sont associées en cas de future exposition. Ils peuvent vivre de quelques semaines à plusieurs années, ce qui est très long comparé aux autres leucocytes vivant en moyenne à peine quelques jours [46] [47].

## B. La tolérance immunitaire

Au long de leur développement, les lymphocytes doivent également passer par un processus d'adaptation leur permettant de différencier le soi du non soi afin d'éviter de confondre le corps lui-même et les pathogènes. La tolérance immunitaire est l'absence ou l'inhibition spécifique centrale ou périphérique, totale ou partielle de la réponse immunitaire vis-à-vis d'un antigène donné ou de certains de ses épitopes, consécutive à un contact (la présentation de l'antigène) préalable du système immunitaire avec celui-ci, contre lequel il aurait pu développer une réponse immunitaire dans d'autres conditions [48]. L'état de tolérance immunitaire est aussi spécifique d'un antigène que l'est la réponse immunitaire et est aussi fondamental que cette dernière pour la préservation de l'intégrité de l'organisme. Sa fonction essentielle est de préserver l'individu de l'auto-réactivité immunologique vis-à-vis des antigènes du soi. L'auto-immunité est donc une attaque du système immunitaire contre le corps lui-même.

### 1. La tolérance centrale

La tolérance centrale est la tolérance établie par la suppression des lymphocytes autoréactifs avant qu'ils ne se développent en cellules complètement immunocompétentes. Ce processus a lieu pendant le développement des lymphocytes dans le thymus au cours de la sélection négative [49] et dans la moelle osseuse pour les lymphocytes T et B respectivement. Dans ces tissus, les lymphocytes en cours de maturation sont exposés à des antigènes du soi présentés par les cellules épithéliales médullaires et les cellules dendritiques du thymus, ou par les cellules de la moelle osseuse. Les antigènes du soi sont présents à cause de l'expression endogène, l'importation d'antigènes de sites périphériques via la circulation sanguine, et, dans le cas des cellules stromales du thymus, l'expression de protéines d'autres tissus que le thymus par l'action du facteur de transcription AIRE.

Les lymphocytes auto-réactifs dont les récepteurs reconnaissent, et donc se lient fortement aux antigènes du soi, sont éliminés par une induction d'apoptose. Certaines cellules T faiblement auto-réactives peuvent être différenciées en cellules T régulatrices naturelles, qui agissent comme sentinelles dans la périphérie pour diminuer de potentiels cas d'auto-réactivité des cellules T.

Cette sélection est plus stringente pour les cellules T que pour les cellules B car les cellules T à elles seules peuvent endommager les tissus. De plus il est plus avantageux pour l'organisme de laisser ces cellules B reconnaître une grande variété d'antigènes de manière à produire des anticorps contre une plus grande diversité de pathogènes. Comme les cellules B ne peuvent être complètement activées qu'après confirmation par des cellules T plus contrôlées qui reconnaissent le même antigène, l'auto-réactivité est contrôlée.

## 2. La tolérance périphérique

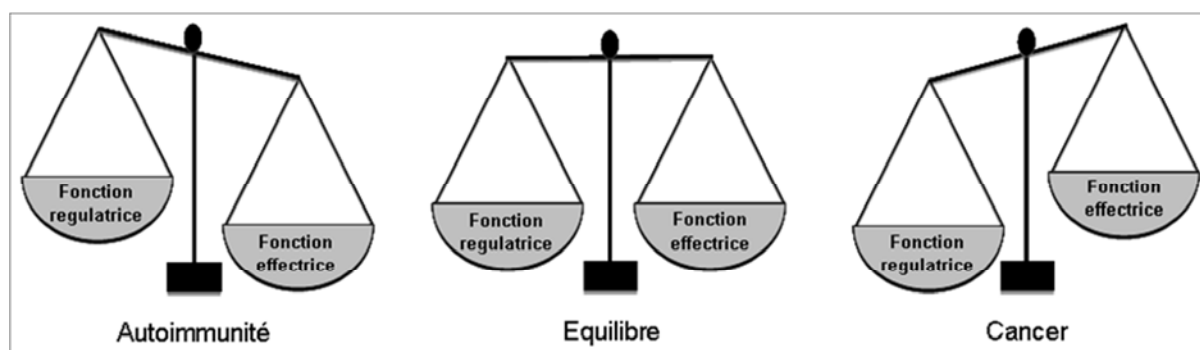
La tolérance périphérique se met en place après que les cellules T et B matures aient rejoint les tissus périphériques et les ganglions. Elle s'établit grâce à plusieurs mécanismes visant à contrôler la quantité de cellules T, notamment les T auxiliaires, qui mettent en place la réponse immunitaire et donnent aux cellules B le signal de confirmation dont elles ont besoin pour produire les anticorps. Il est toutefois possible que des lymphocytes T possédant un faible pouvoir auto-réactif quittent le thymus sans être éliminés ; dans certains cas ces cellules peuvent porter un TCR réagissant très faiblement à un antigène du soi fortement présent et donc entraîner une réaction. Cependant ces cellules T auto-réactives peuvent être délétées ou rendues inopérantes dans les tissus périphériques par les cellules T régulatrices.

Il est également possible de bloquer une réaction contre certains antigènes par une tolérance induite après des expositions répétées ou une exposition dans un certain contexte. Dans ces cas-là il y a une différenciation de cellules T  $CD4^+$  naïves en cellules T régulatrices

adaptatives (aTreg) dans les tissus périphériques ou à proximité de tissus lymphoïdes (comme les ganglions). Cette différenciation est mise en place par l'IL-2 produite par l'activation des cellules T et le TGF- $\beta$  pouvant provenir de cellules dendritiques ou d'autres cellules présentatrices d'antigènes [50]. En plus des cellules T régulatrices, d'autres types cellulaires permettent la tolérance périphérique : les cellules Tr1 ou les Th3 peuvent aider à établir une tolérance locale [51]. Les lymphocytes B peuvent également participer à la tolérance, tout d'abord par l'expression de CD22, un inhibiteur non-spécifique qui diminue leur activation ; de plus certaines cellules B régulatrices produisent également de l'IL-10 et TGF- $\beta$ . Certaines cellules dendritiques peuvent également bloquer la réaction de cellules T qui reconnaissent des antigènes très fortement exprimés et donc entraîner un état d'équilibre [52].

### C. Equilibre dynamique du système immunitaire

Il existe un équilibre entre ces types de lymphocytes T (**Figure 8**). Les Treg peuvent contrôler la prolifération des Teff, on peut les identifier parmi les CD4<sup>+</sup> par le marqueur CD25 sur leurs membranes et par leur expression du facteur de transcription FoxP3 [53].

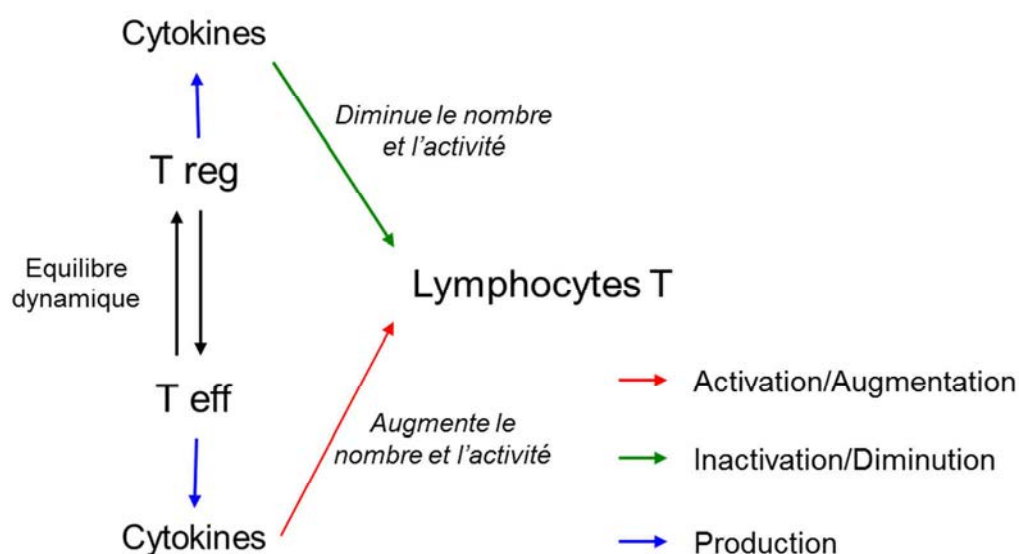


**Figure 8** : Equilibre entre les fonctions effectrices et régulatrices du système immunitaire. Le maintien constant d'un équilibre entre ces fonctions est très important, une fonction régulatrice trop forte pouvant induire un cancer tandis qu'une fonction effectrice non-contrôlée peut provoquer l'auto-immunité.

Le système immunitaire joue un rôle qui est donc très complexe à double titre car il agit d'une part en éliminant des structures et molécules qui menacent la survie et/ou l'intégrité de l'organisme, ce qui correspond à la fonction effectrice, et d'autre part en évitant aux structures et molécules nécessaires à la survie de l'individu et de l'espèce, donc à ses propres organes, cellules et molécules, d'être des cibles latérales, mais aussi en facilitant leurs fonctions ou même, éventuellement leur croissance, ce qui équivaut donc à une fonction de régulation. En effet, les réponses immunitaires et auto-immunes sont régulées par un équilibre subtil entre les fonctions effectrices et régulatrices de ce même système. Les principaux acteurs de cette régulation sont les protéines utilisées par le système immunitaire comme messagers et régulateurs, les cytokines.

#### D. La dérégulation du système immunitaire

On peut donc considérer que le phénomène d'équilibre dynamique entre les différents types de cellules T (régulatrices et effectrices) influence la réponse immunitaire par le contrôle que ces cellules exercent, y compris par la quantité et le type de cytokines produites sur le reste des cellules du système immunitaire (**Figure 9**).



**Figure 9 :** Schéma simplifié de l'action des cellules T régulatrices et effectrices sur la prolifération des lymphocytes T par l'intermédiaire de leurs cytokines spécifiques.

Dans des conditions normales, ce mécanisme d'équilibre entre les différentes fonctions des lymphocytes permet une adaptation aux différentes conditions rencontrées. En cas d'invasion de l'organisme par un pathogène, l'équilibre va pencher vers une augmentation de la prolifération et de l'activité des lymphocytes T (ainsi que d'autres composants du système immunitaire) de manière à lutter plus efficacement, et quand la menace aura disparu le système va retourner à son état « normal ». Cependant, dans le cas de nombreuses maladies auto-immunes, et notamment dans celui du diabète de type 1, on observe un déséquilibre de ce système [54]. Dans le cas du diabète, ce système est modifié dans le sens d'une plus forte réponse immunitaire, qui va entraîner une réaction inadaptée contre le soi, il s'agit donc d'une trop forte prolifération des cellules T effectrices comparées aux régulatrices. Etant donné le plus puissant contrôle des cellules régulatrices sur les effectrices, plusieurs études ont montré que si on influence le système immunitaire pour accentuer leur effet on peut empêcher le diabète d'apparaître [55] [56] voire même contrôler un diabète déjà présent [57]. Ces études prouvent que l'on peut contrôler le fonctionnement du système immunitaire en agissant sur cet équilibre dynamique des lymphocytes, notamment par l'intermédiaire de leurs cytokines spécifiques.

## E. Les cytokines

### 1. Généralités sur les cytokines

Les cytokines (du grec cyto : cellule et kinos : mouvement) sont une famille vaste et diverse de petites protéines (~5–20 kDa) très importantes pour la signalisation cellulaire. Elles sont produites et relâchées par certaines cellules afin de modifier le comportement d'autres cellules et parfois celui de la cellule productrice elle-même. Les cytokines incluent les chemokines, interférons, interleukines, lymphokines, facteurs de nécrose tumorale, mais ne comprennent pas les hormones ou les facteurs de croissance. Les cytokines sont produites par une large

variété de cellules, parmi lesquelles des cellules immunitaires telles que les macrophages, les lymphocytes B et T ainsi que les cellules endothéliales, les fibroblastes et plusieurs types de cellules stromales ; une cytokine donnée peut être produite par plusieurs types de cellules sans pour autant avoir forcément le même effet sur chaque [58].

Elles agissent par l'intermédiaire de récepteurs et sont particulièrement importantes pour le système immunitaire, dont elles régulent l'équilibre ; et elles régulent également la prolifération, la maturation et le degré de réponse de populations de cellules particulières. Certaines cytokines augmentent ou diminuent l'action d'autres cytokines dans des mécanismes complexes [59]. Elles sont différentes des hormones, molécules également très importantes de la signalisation cellulaire, dans la mesure où les hormones circulent en concentrations bien moins élevées et ont tendance à être produites par des types de cellules très spécifiques.

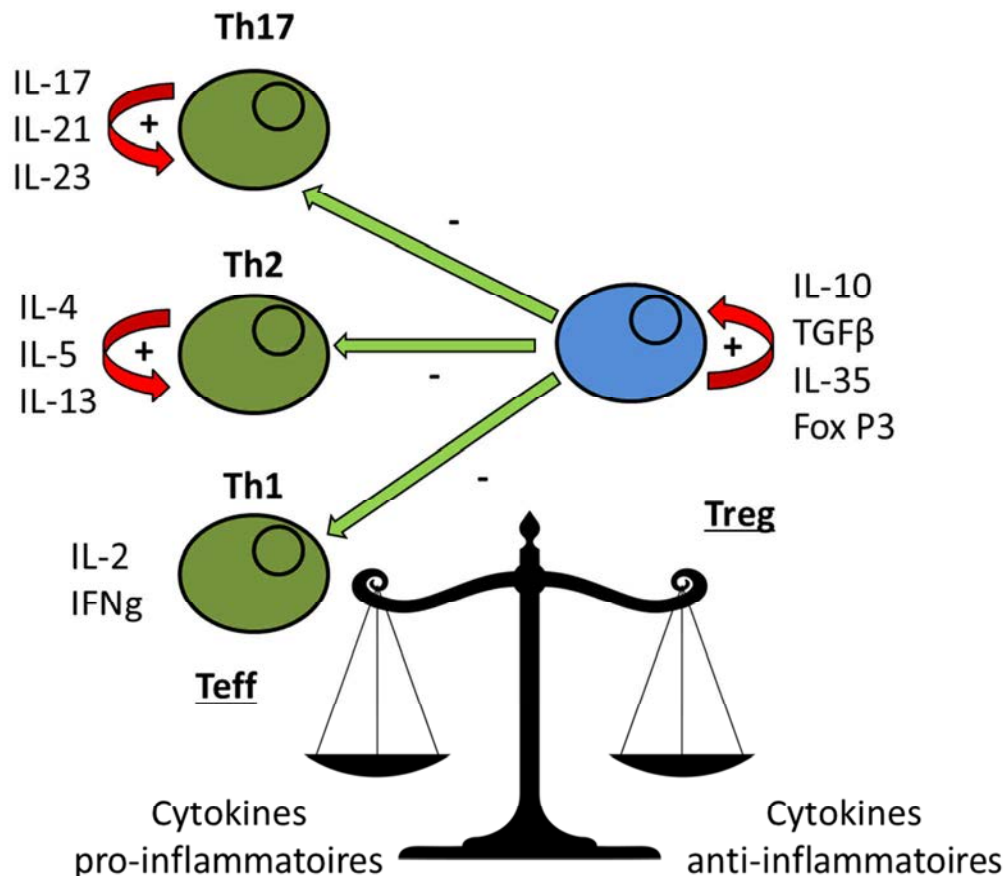
Elles sont liées à de nombreuses maladies et mécanismes de défense, spécifiquement dans la réponse aux infections, les réponses immunitaires, l'inflammation, les traumatismes, la sepsis, le cancer et la reproduction.

Chaque cytokine possède un récepteur de surface associé. Des cascades de signalisation cellulaire peuvent donc altérer ces fonctions. Cela peut inclure des surexpressions ou sous-expressions de nombreux gènes et de leurs facteurs de transcription associés, résultant en la production d'autres cytokines, ce qui augmenterait le nombre de récepteurs de surface à d'autres molécules, ou la suppression de leurs propres effets par un feedback négatif [60].

L'effet d'une cytokine sur une cellule spécifique dépend de la cytokine, de son abondance extracellulaire, de la présence et de l'abondance du récepteur complémentaire à la surface de la cellule et des signaux en aval activés par la liaison sur le récepteur, ces deux derniers facteurs pouvant varier selon le type cellulaire. Les cytokines sont caractérisées par leur considérable redondance, de nombreuses cytokines semblant partager des fonctions similaires.

Il existe de nombreuses sous-catégories au sein d'une même famille de cellules immunitaires, notamment chez les lymphocytes T, ces cellules possèdent différentes fonctions, souvent liées aux cytokines qu'elles produisent. Il est donc possible de classifier ces sous-catégories en fonction des cytokines qu'elles produisent, certaines sont communes à plusieurs sous-catégories mais d'autres sont très spécifiques. Ceci est très intéressant du point de vue de la recherche, car cela permet de caractériser les sous-populations de cellules en fonction des cytokines qu'elles expriment. On sait par exemple que les cellules produisant FoxP3 sont des régulatrices et celles produisant les cytokines IFN $\gamma$ , IL-4 et IL-17 sont respectivement des Th1, Th2 et Th17. Ces cytokines sont très importantes dans l'équilibre immunitaire car certaines d'entre elles agissent sur la prolifération des cellules qui les produisent (comme IL-17 ou IL-21) voire même vont, directement ou non, diminuer la prolifération d'autres types cellulaires comme par exemple FoxP3, produite par les T régulatrices, qui augmente leur prolifération ce qui diminue la prolifération des cellules T effectrices (**Figure 10**).



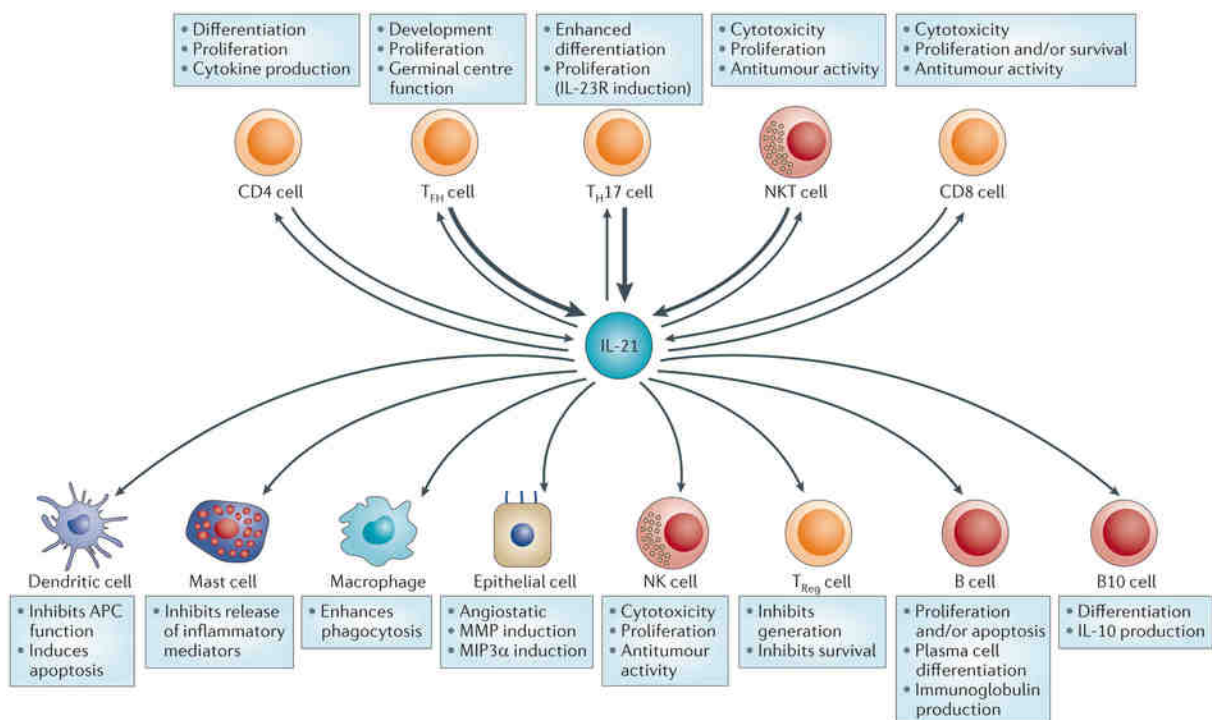


**Figure 10 :** Equilibre existant entre les cellules Teff, agissant de manière générale de façon pro-inflammatoire et les cellules Treg, agissant de manière générale de façon anti-inflammatoire et production des cytokines majeures des différents types de cellules T et effets de ces cytokines sur l'équilibre immunitaire. En plus de leur capacité à augmenter leur propre prolifération, les cellules Treg sont capables de diminuer la prolifération des cellules Teff.

Dans cet exemple, l'équilibre entre les effets pro et anti-inflammatoires est dû à l'équilibre entre les cellules effectrices et régulatrices et agit sur la capacité du système immunitaire à réagir. La moindre perturbation de cet équilibre, que ce soit sur les cellules elles mêmes ou sur les cytokines qu'elles produisent, entraîne une variation sur la prolifération, et donc les proportions, de ces différents types de cellules, ce qui peut changer l'intégralité de la capacité de réponse du système immunitaire.

## 2. L'interleukine-21

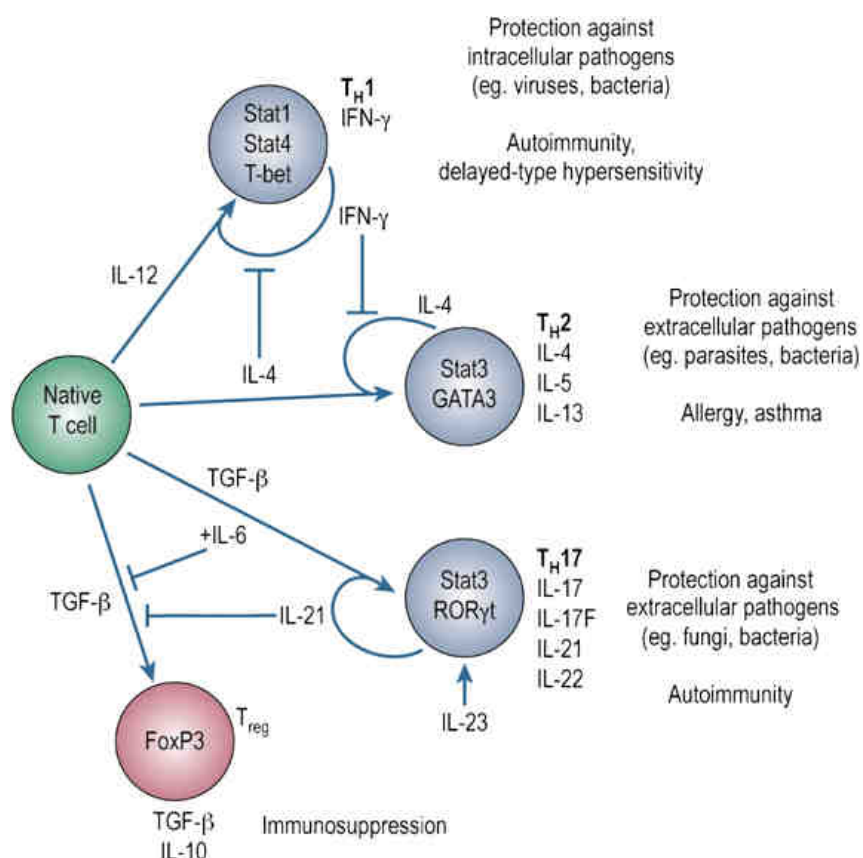
L'une de ces cytokines est actuellement très étudiée car liée à de nombreux mécanismes immunitaires : l'interleukine-21. IL-21 est une cytokine de type I, dans cette classification regroupant les cytokines en fonction de leur configuration 3D la classe I regroupe toutes celles contenant 4 hélices alpha. IL-21 contrôle la réponse immunitaire par son interaction avec IL-21R, un récepteur à chaîne  $\gamma$  commun. Cette interleukine est majoritairement exprimée par les cellules Th17 et  $T_{FH}$ , cellules membres de la famille des  $CD4^+$  et agit sur ses gènes cibles par l'activation des messagers Jak/Stat, MAPK et PI3K [61] [62] [63]. Les cellules cibles d'IL-21 incluent notamment les cellules B, les cellules T [64] et les natural killer [65] cependant les effets de cette cytokine dépendent du type de cellules affectées (**Figure 11**).



Nature Reviews | Drug Discovery

**Figure 11 :** L'Interleukine-21 (IL-21) est produite par les cellules T  $CD4^+$ , la plupart de la production étant due aux cellules T folliculaires et aux Th17, et à une échelle beaucoup plus faible par les cellules T natural killer et par les cellules CD8. IL-21 agit sur les populations lymphoïdes et myéloïdes ainsi que sur les cellules épithéliales. L'effet d'IL-21 est décrit pour chaque type cellulaire [63].

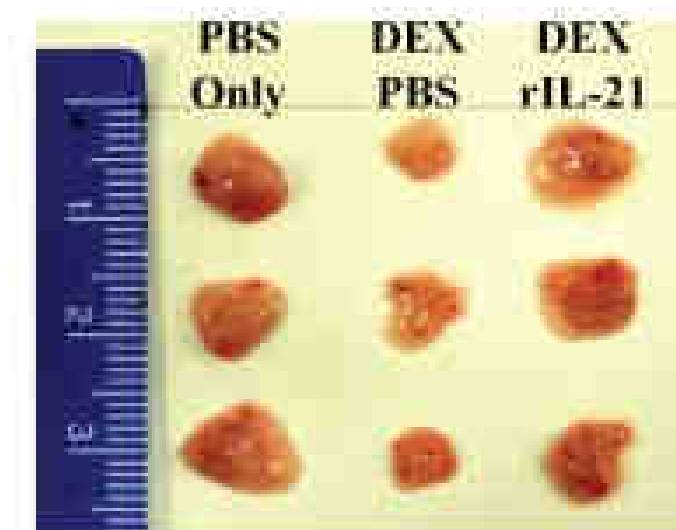
Etant donné les très nombreuses interactions existant entre les interleukines entre elles et entre les cellules qu'elles régulent, il est souvent difficile de prendre en compte tous les effets d'une cytokine donnée, mais on peut, en se concentrant sur un contexte particulier, définir un effet global : dans le cas d'IL-21 ces effets semblent tendre pour la plupart vers une amplification de la réponse immunitaire. En effet, de hauts niveaux d'IL-21 entraînent une amplification de la réponse immunitaire et peuvent même induire à eux seuls des réactions immunitaires. Le gène *Il-21* est un candidat du diabète de type 1 situé dans le locus murin *Idd3* [66] [67] [68]. Les effets d'IL-21 sont très nombreux mais le plus important semble être une augmentation de la survie et de la prolifération des cellules T [69]. IL-21 est également un élément très important de la différenciation des lymphocytes T en Th17 dans le thymus [70] [71] (**Figure 12**).



**Figure 12 :** Différentes voies de spécialisation des cellules naives. En fonction de signaux reçues ces cellules sont capables de se différencier en cellules régulatrices (Treg produisant Fox P3) ou effectrices (Teff). [71]

Au cours de cette spécialisation IL-21 agit non seulement comme un promoteur de la voie des Th17 [72] mais diminue également la spécialisation des cellules naïves en cellules régulatrices, leur prolifération et leur action [73]. Ce qui semble être un effet complémentaire quand on prend en compte l'équilibre dynamique existant entre les cellules T régulatrices et effectrices.

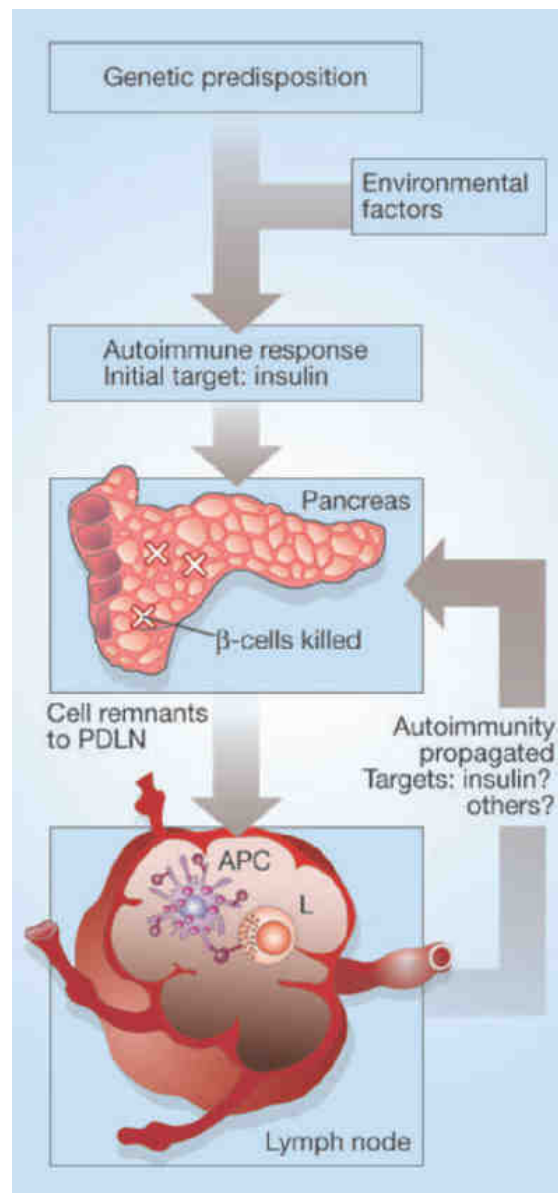
Un autre aspect du rôle d'IL-21 est sa capacité à inhiber l'apoptose ou à accélérer la récupération cellulaire suite à l'apoptose des thymocytes [45]. Il est donc possible que son influence sur les proportions des différents types de cellules immunitaires commence dès leur différenciation dans le thymus, en effet, si une variation d'IL-21 change la proportion de cellules effectrices subissant ou non l'apoptose au cours de la phase de développement dans le thymus, cela peut modifier l'équilibre immunitaire dans tout l'organisme par la suite (**Figure 13**) [74] [75].



**Figure 13 :** Photographie représentative de thymus de souris après différents traitements: injection de PBS, de PBS et de dexaméthasone (DEX : hormone glucocorticoïde provoquant l'apoptose cellulaire) ou de DEX et d'IL-21. Prouvant ainsi l'effet protecteur d'IL-21 contre l'apoptose.

### **III. L'auto-immunité : le cas du diabète de type 1**

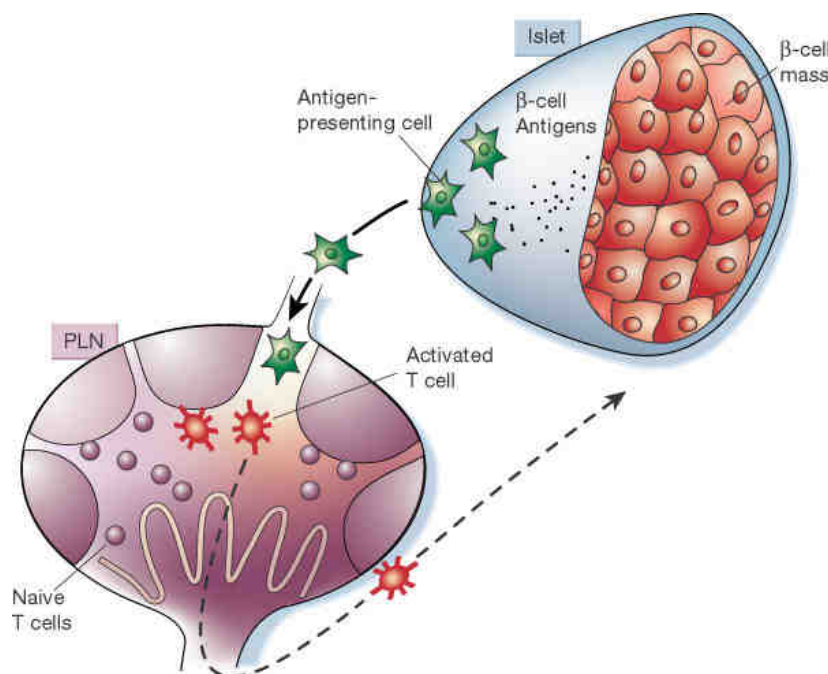
Ces différents mécanismes sont importants pour essayer de mieux comprendre la mise en place du diabète de type 1. Cette maladie est dite multifactorielle et polygénique, ce qui signifie que de nombreux paramètres, notamment des phénomènes génétiques et environnementaux interviennent dans sa mise en place, la part génétique étant due à plusieurs gènes. On sait notamment que la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans est due aux cellules T, on peut donc se demander si cette destruction résulte d'un défaut de ces cellules T, de leur nombre, leur activation, leur sélection... ou plus généralement d'une altération du système de tolérance, ou bien d'un problème lié directement aux cellules bêta. Il est donc crucial de bien comprendre comment se développe cette maladie pour pouvoir étudier ces différents aspects (**Figure 14**).



**Figure 14 :** Les prédispositions génétiques déterminent presque à elles seules si une personne va développer une réactivité immunologique contre les cellules bêta productrices d'insuline du pancréas. Cependant des facteurs environnementaux tels que la nutrition ou les infections peuvent avoir un impact majeur pour déterminer si le diabète de type 1 va se manifester cliniquement. Cela arrive après que 80-90% des cellules bêta aient été détruites. Ce qui reste de ces cellules est transporté dans les ganglions pancréatiques où le processus auto-immun sera coordonné. Les débris des cellules bêta seront collectés par des cellules présentatrices d'antigène (APC) et accessibles aux lymphocytes, les incitant à soit détruire plus de cellules bêta ou signaler une réponse immunitaire plus accentuée. [76]

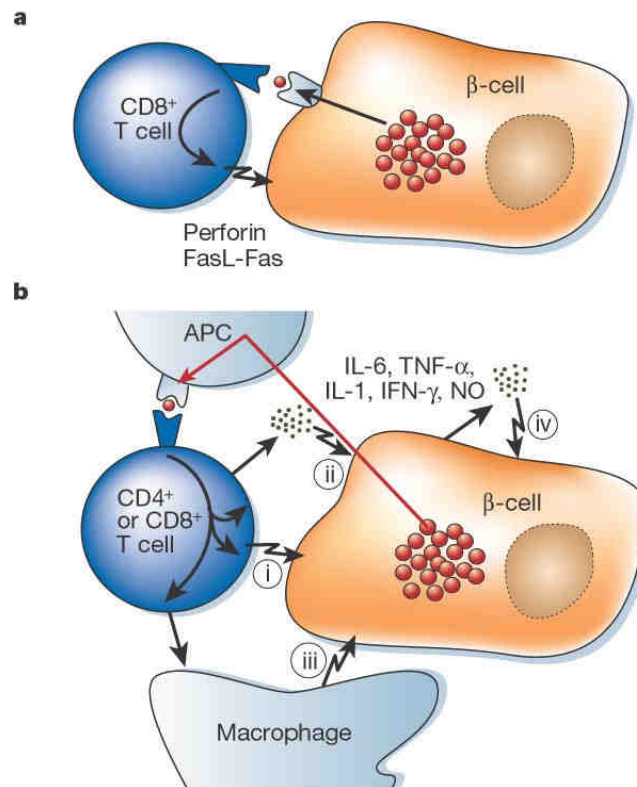
### A. Développement de la maladie

Pour des raisons encore peu connues, chez certains sujets porteurs de prédispositions génétiques, un ou plusieurs facteur environnemental va déclencher une dysrégulation immunitaire ce qui va entraîner que certaines cellules bêta productrices d'insuline vont entrer en apoptose. Cela relargue des protéines ainsi que d'autres composants cellulaires qui sont considérés comme des auto-antigènes. Ils sont capturés par les APCs et présentés à des lymphocytes T naïfs dans les ganglions pancréatiques (PLNs) (**Figure 15**).



**Figure 15 :** Les cellules T naïves (sphère violette) circulent dans le sang et les organes lymphoïdes, y compris les ganglions pancréatiques (PLNs). Dans les ganglions, ils rencontrent des APCs, le plus souvent des cellules dendritiques, présentant à leur surface des molécules du CMH portant des antigènes sous forme de fragments peptidiques. Dans ce cas, les antigènes dérivent de protéines synthétisées par les îlots pancréatiques des cellules  $\beta$ , récupérées sous forme soluble, venant de fragments de cellules ou de cellules apoptotiques quand les APCs, probablement des cellules dendritiques immatures, séjournèrent dans les îlots. Une fraction des cellules T naïves peuvent reconnaître les complexes molécules du CMH/antigène des cellules  $\beta$ , sont activés (astérisque rouge), et se rendent dans les différents tissus de l'organisme (y compris le pancréas) ou ils rencontrent à nouveau cet antigène et sont réactivés [77].

Les lymphocytes T sont alors activés, infiltrent les îlots de Langerhans et détruisent progressivement les cellules bêta du pancréas (ce phénomène est appelé l'insulite) (**Figure 16**).

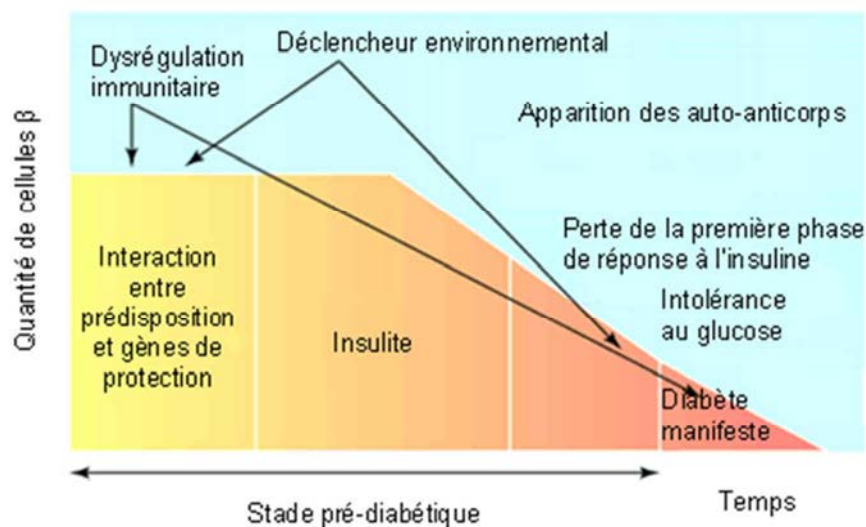


**Figure 16 :** a, Selon les mécanismes de “reconnaissance par liaison”, la cellule T (ici une cellule T CD8<sup>+</sup>) est activée par reconnaissance directe de l’antigène de la cellule β (point rouge) présentés par la molécule du CMH, dans ce cas il s’agit d’une molécule de classe 1, de la cellule β. Cette activation provoque la destruction de la cellule β. b, Selon les mécanismes de “l’activation par liaison”, la cellule T (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) reconnaît l’antigène des cellules β présenté indirectement par les APCs comme les macrophages ou les cellules β. (i); Cytokines et autres médiateurs de morts cellulaire produits par les cellules T (ii); activation des macrophages (iii); activation des cellules β et stimulation de leur production de mort cellulaire (iv) [77].

L'insulite est une lésion trouvée dans les îlots de Langerhans de près de 70% des enfants présentant un diabète de type I depuis moins d'un an. Ce phénomène consiste en une accumulation de cellules immunitaires dans les îlots de Langerhans, surtout des lymphocytes CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, des macrophages CD68<sup>+</sup>, des lymphocytes T CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes B CD20<sup>+</sup>. L'infiltrat peut être présent en un simple cluster de cellules immunitaires à une



extrémité de l'îlot (peri-insulitis) ou sous une forme plus diffuse (intra-insulitis). Seule une petite fraction des îlots montrent une insulite, la plupart (50-60%) apparaissent « pseudo-atrophiques », ils ont déjà perdu toutes leurs cellules bêta contenant de l'insuline. Cette perte spécifique de cellules bêta est un indicateur de la maladie, le mécanisme auto-immun des cellules T apparaît dirigé contre un antigène inconnu des cellules bêta. Tous les îlots ne sont pas affectés par la maladie, une proportion variable (en moyenne 30%) ne montre aucun signe de changements histopathologiques. Les cellules bêta restantes déclinent progressivement avec le temps et quelques-unes d'entre elles demeurent présentes chez la plupart des patients même après plus de 50 ans de maladie (**Figure 17**).



**Figure 17 :** Représentation des différentes phases successives d'un diabète de type 1. On peut constater que l'apparition des symptômes correspond à la diminution de la quantité de cellules bêta et donc à la baisse de la sécrétion d'insuline.

## B. Symptômes

Les symptômes les plus classiques du diabète sont la polyurie (miction fréquente), la polydipsie (augmentation de la sensation de soif), la xérostomie (sécheresse de la bouche), la polyphagie (augmentation de la sensation de faim), la fatigue et une perte de poids. De nombreux patients sont diagnostiqués quand ils développent une acidocétose diabétique, les symptômes incluant la xérodermie (peau sèche), des troubles respiratoires, des douleurs abdominales et des vomissements [78].

## C. Diagnostic

Le diabète est caractérisé par une hyperglycémie persistante ou récurrente et peut être diagnostiqué par l'un des symptômes suivants :

- Un taux de glucose à jeun supérieur ou égal à 7.0 mmol/L (126 mg/dL).
- Un taux de glucose dans le sang supérieur ou égal à 11.1 mmol/L (200 mg/dL) deux heures après une prise orale de 75g de glucose lors d'un test de tolérance au glucose.
- Des symptômes d'hyperglycémie et un taux de glucose sanguin supérieur ou égal à 11.1 mmol/L (200 mg/dL).

Les diabètes sont souvent détectés quand une personne souffre d'un problème qui pourrait être causé par le diabète, tels que les crises cardiaques, les neuropathies, une cicatrisation ralentie, un ulcère du pied, certains types de troubles de la vision ou infections fongiques.

#### D. Complications à long terme

Si les symptômes comme la polyurie, la polydipsie et la xérostomie peuvent sembler relativement légers, il faut prendre en compte le fait que cette maladie se déclare assez jeune et accompagnera les patients tout au long de leur vie, il n'est donc pas étonnant que des complications à long terme se développent.

- Acidocétose diabétique

Des niveaux trop faibles d'insuline obligent le foie à transformer les acides gras en cétone pour produire l'énergie manquante due à l'absence de glucose intracellulaire, les corps cétoniques sont un substrat intermédiaire de cette transformation. Des niveaux élevés de corps cétoniques dans le sang en diminuent le pH, entraînant l'acidocétose.

- L'état hyperosmolaire hyperglycémique

Chez une personne présentant un taux de sucre très élevé, l'eau est drainée des cellules vers le sang par osmolarité et les reins finissent par relâcher du glucose dans l'urine. Cela entraîne une perte d'eau et une augmentation de l'osmolarité du sang.

- Maladies chroniques

##### Mécanismes des complications chroniques

Une augmentation chronique du taux de sucre cause des dégâts aux vaisseaux sanguins (angiopathie). Les cellules endothéliales bordant les vaisseaux sanguins récupèrent plus de glucose que la normale étant donné qu'elles ne dépendent pas de l'insuline. Elles mettent en place par la suite plus de glycoprotéines de surface que la normale, ce qui entraîne un amincissement et un affaiblissement de la membrane basale de ces cellules. Dans le cas du diabète, les problèmes qui en résultent sont catalogués en tant que « maladies

microvasculaires », causées par les dégâts aux petits vaisseaux sanguins et « maladies macrovasculaires », causés par des dégâts aux artères.

#### Exemple de complications chroniques

- Cardiomyopathies diabétiques : dégâts au cœur entraînant un dysfonctionnement diastolique et un risque de crise cardiaque.
- Néphropathie diabétique : dégâts aux reins qui peuvent entraîner des dysfonctionnements rénaux pouvant nécessiter des dialyses.
- Neuropathies diabétiques : sensations de toucher anormales et diminuées, la plupart du temps avec une distribution aux extrémités commençant dans les pieds mais potentiellement au niveau d'autres nerfs, généralement au niveau des doigts et des mains.
- Rétinopathie diabétique : mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins friables et de mauvaise qualité dans la rétine ainsi que d'œdèmes maculaires (gonflement de la macula), ce qui peut entraîner de sévères pertes de vision ou la cécité.

#### E. Thérapies

- Traitement à l'insuline

Des injections d'insuline, par injections sous-cutanées ou grâce à une pompe à insuline, sont nécessaires pour les personnes souffrant de diabète de type 1. Aujourd'hui la plupart de l'insuline est biosynthétisée, produite par des techniques de recombinaison génétique.

Les traitements contre le diabète se concentrent sur l'abaissement du glucose dans le sang à un taux normal, le but ultime étant d'éviter les complications sur le long terme qui affectent le système nerveux, comme les neuropathies périphériques, et le système cardiovasculaire, ce

qui peut causer des crises cardiaques ou des pertes de la vision. Une surveillance continue du taux de glucose peut alerter les patients d'un niveau dangereusement haut ou bas mais cela peut s'avérer insuffisant.

- La greffe de pancréas

Dans des cas plus extrêmes, une greffe de pancréas peut remettre en place une régulation efficace du glucose. Cependant la chirurgie et le processus d'immunosuppression l'accompagnant peuvent s'avérer plus dangereux qu'un traitement continu à l'insuline. Ce processus n'est donc généralement utilisé que dans le même temps ou peu après une greffe de reins, nécessitant également la prise d'immunosuppresseurs tels que la cyclosporine. L'avantage est donc de permettre la mise en place d'un pancréas fonctionnel chez un patient diabétique sans thérapie immunosuppressive supplémentaire.

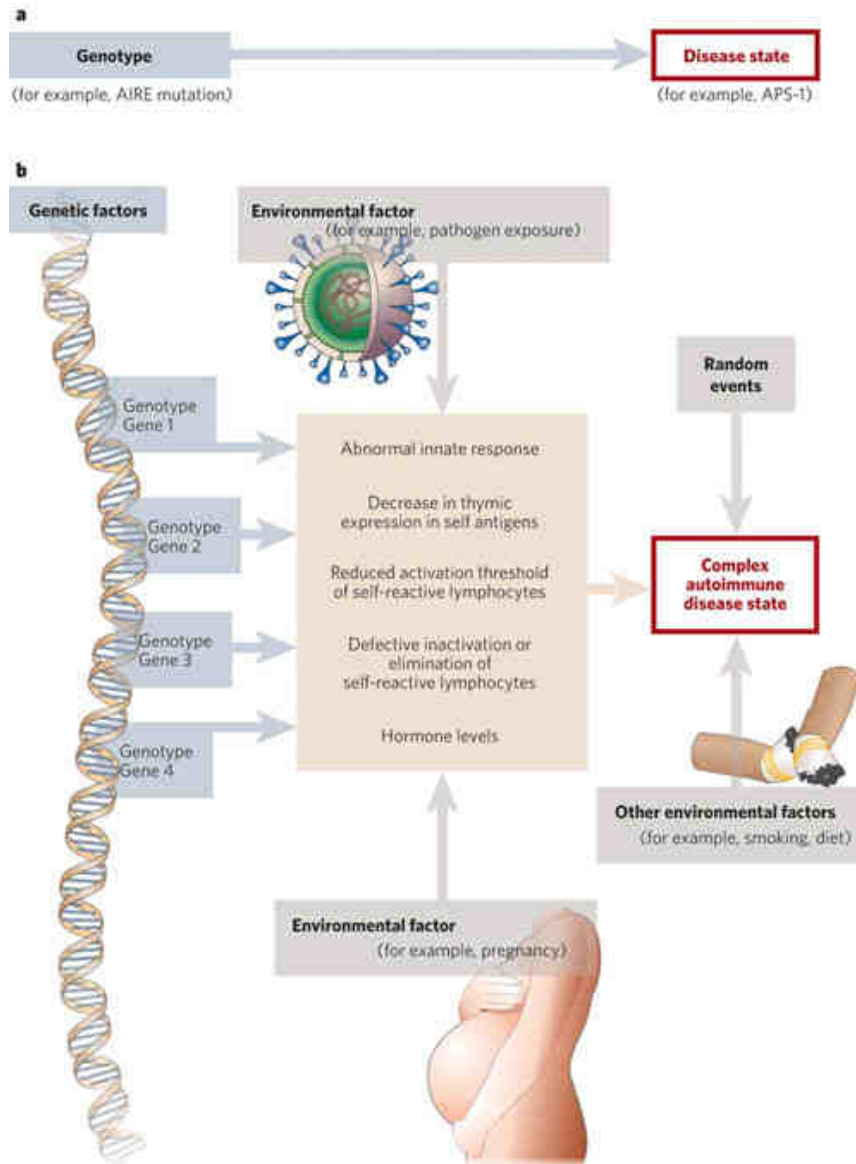
- Greffe d'îlots

Un remplacement des cellules bêta des îlots de Langerhans détruites lors de la mise en place du diabète par greffe de cellules souches capable de se différencier en cellules bêtas est actuellement à l'étude. Une greffe d'îlots étant moins invasive qu'une greffe de pancréas [3].

Une des techniques consiste à injecter les îlots dans le foie du patient, où ils se fixent et produisent de l'insuline. Le foie semble le choix le plus logique car il est plus accessible que le pancréas, et les tests montrent que les îlots peuvent y produire de l'insuline très efficacement. Le corps du patient va cependant traiter ces nouvelles cellules comme n'importe quel tissu étranger, à moins qu'une méthode soit mise en place pour les produire à partir des cellules souches du patient lui-même. Dans le cas contraire, le système immunitaire va attaquer ces cellules et les détruire, arrêtant la production d'insuline. Ces patients auraient donc besoin d'un traitement immunosuppresseur, réduisant l'activité du système immunitaire.

#### IV. Facteurs génétiques et environnementaux

Dans les maladies multifactorielles, de nombreux paramètres environnementaux et génétiques s'entrecroisent, ce qui rend l'étude et les traitements très complexes (**Figure 18**).



**Figure 18 :** a. Dans le cas des maladies monogéniques, le rapport entre variant génétique (génotype) et phénotype (maladie) est de type déterministe. b. Dans le cas de maladies complexes dites multifactorielles, le déclenchement de la maladie dépend de la combinaison d'un ensemble de loci de prédisposition, de facteurs environnementaux et d'évènements stochastiques. Chaque variant génétique à un locus de prédisposition affecte un ou plusieurs composants du système immunitaire ou de l'organe cible, ce qui entraîne une réponse immunitaire altérée vis-à-vis d'antigènes du soi. Chaque variant individuel a une influence modérée sur le développement de la maladie, mais il existe des gènes dits majeurs comme le CMH ou l'insuline dans le cas du diabète de type 1 [79].

Les détails exacts des évènements aboutissant à la mise en place d'un diabète de type 1 sont encore à approfondir. Plusieurs théories sont actuellement étudiées, par exemple l'exposition à des antigènes, les prédispositions génétiques et le seuil de déclenchement du diabète [80]. Globalement, on peut regrouper les facteurs déclenchant en deux catégories: génétiques et environnementaux.

#### A. Facteurs génétiques

Le diabète de type 1 est une maladie complexe et multigénique et les recherches ont depuis longtemps visé à identifier ses facteurs génétiques de prédisposition. Dans le cas d'une étude sur cette maladie, les ADN des participants sont comparés entre les individus atteints et non-atteints, servant de contrôles. Les différents SNP sont analysés et si l'un des variants est plus fréquent chez les personnes atteintes, on dit qu'il est associé à la maladie et la région génétique sur laquelle il se trouve est considérée comme l'influençant et peut être plus étudiée pour trouver un ou plusieurs gènes directement liés à la maladie [81]. Dans le cas du diabète de type 1, ces études ont permis de mettre en évidence de nombreuses régions du génome impliquées dans la maladie [82]. Ces régions appelées loci de susceptibilité sont désignées par l'abréviation IDDM accompagnée d'un chiffre correspondant généralement à l'ordre dans lequel ils ont été identifiés. Certains d'entre eux n'ont pas encore de rôles clairement identifiés, sans doute à cause de la faible influence qu'ils exercent de façon isolée sur le diabète.

Historiquement 6 loci ont été identifiés comme associés au diabète de type 1 grâce à une approche gène candidat. La région HLA (human leukocyte antigen) sur le chromosome 6p21 a été le premier candidat fortement associé au diabète de type 1 dans les années 70 [83] [84] [85]. Ce cluster de gènes homologues codant pour des protéines de surface est divisé en classe I (A, B et C) et classe II (DP, DQ et RD). Les gènes HLA codent des protéines très

polymorphiques, qui sont essentielles dans la reconnaissance du soi et du non-soi. En 1984, le gène codant pour l'insuline situé sur le chromosome 11p15 fut identifié comme second loci lié au diabète de type 1 [86]. En 1996, le gène CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) sur le chromosome 2q33 a été également reconnu comme loci de susceptibilité [87]. En 2004, une autre étude de cas-contrôle a identifié le gène PTPN22 (protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22) situé sur le chromosome 1p13 associé à la maladie [88]. En 2005 se fut le gène IL2RA codant pour l'interleukin 2 receptor alpha, loci situé sur le chromosome 10p5 [89]. Et en 2006 le gène IFIH1 (interferon-induced with helicase C domain 1) sur le chromosome 2q24.3 [90].

Cependant dans le cadre d'une maladie aussi complexe et impliquant autant de gènes que le diabète de type 1, il est difficile d'identifier des gènes avec ces techniques. Le diabète de type 1 est une maladie faisant intervenir de nombreux gènes, cependant tous n'ont pas le même impact, par exemple selon s'ils sont dominants ou récessifs et l'impact qu'ils vont avoir sur les risques de développer la maladie.

Il existe une technique alternative : les études d'association génétique. Ce genre d'études cherche si un allèle spécifique d'un variant génétique est trouvé plus souvent chez des individus avec le phénotype d'intérêt (comme une maladie) [91].

Des techniques ont donc été mises au point à partir de ces études afin d'identifier les gènes impliqués à plus large échelle. Certaines reposent sur le fait qu'il existe des millions de différences entre les génomes de deux humains, ces différences peuvent être de petites variations d'un seul nucléotide (SNP) comme de grandes variations telles que des délétions ou des insertions. Ces différences peuvent entraîner des modifications sur le phénotype d'un individu comme des caractéristiques physiques ou des prédispositions à des maladies, ou être totalement sans effet.



Comme on connaissait une grande variété de ces SNP disséminés dans le génome, on cherchait alors si les personnes atteintes de maladies portaient une version particulière de chaque SNP, et quand un SNP était associé à la maladie, on cherchait un gène à proximité pouvant l'influencer. Cette approche était très efficace dans le cadre de maladies monogéniques mais beaucoup moins pour les maladies complexes faisant intervenir plus de gènes et dont les résultats présentaient beaucoup plus de variations [92].

Il s'agit des études de GWAS (Genome Wide Association Study). Un GWAS est une étude d'association des SNP menée sur un grand nombre d'individus afin de chercher si une variation génétique peut être reliée à une pathologie. Cette approche est dite « non-candidate » car elle cible le génome dans son ensemble. Ces études se concentrent sur les polymorphismes d'un seul nucléotide, des nucléotides connus pour varier selon les individus, et peuvent servir à identifier des gènes liés à des maladies complexes comme le diabète. Par l'approche gène candidat, des études d'association ont permis d'identifier les deux loci les plus importants: la région du HLA (IDDM1) et le gène de l'insuline (INS) (IDDM2) (**Figure 19**).



protéines participant soit à adapter la réponse des récepteurs des cellules T et B soit indirectement par le contrôle des populations de cellules régulatrices, vitales au contrôle de l'auto-immunité [95].

La deuxième région la plus fréquemment observée comme liée à une prédisposition au diabète de type 1 (IDDM2) correspond à la région codant l'insuline située sur le chromosome 11 [86]. Ce gène est un candidat évident pour le diabète de type 1 et a été confirmé par des études d'association et de liaison [96], qui ont démontré que la région de 4.1 Kb contient plusieurs polymorphismes associés au diabète de type 1.

L'un de ces polymorphismes associés à une augmentation du risque de diabète est lié à une diminution d'expression du gène de l'insuline et de la protéine associée dans le thymus par comparaison avec l'allèle dominant. Cela entraîne une diminution de la tolérance centrale vis-à-vis de l'insuline et donc permet à plus de cellule T auto-réactives de migrer vers la périphérie où elles ont plus de chance de détruire les cellules bêta des îlots de Langerhans [97] [98]. Des études récentes ont depuis montré que l'insuline et ses précurseurs sont de potentiels auto-antigènes dans le cas du diabète de type 1 [99], ce qui renforce fortement cette hypothèse.

En effet, l'insuline est le seul auto-antigène potentiel humain dont l'expression dans les îlots du pancréas soit limitée aux cellules bêta. Des auto-anticorps anti-insuline ont été identifiés chez des personnes présentant des risques élevés de diabète ainsi que chez des patients développant un diabète [100]. De plus, des cellules T auto-réactives contre des peptides de l'insuline ou de la proinsuline ont été identifiées chez des patients diabétiques et pré-diabétiques, y compris des cellules T CD8 [101].

Ces résultats ont été confirmés chez la souris NOD, une lignée de souris développant naturellement un diabète proche du diabète de type 1 humain, chez qui les cellules T auto-

réactives contre l'insuline représentent environ 40% des infiltrats lymphocytaires dans le pancréas durant le développement du diabète [102] et chez qui on trouve des cellules T CD4 et CD8 reconnaissant spécifiquement l'insuline [103].

De plus, il a été récemment démontré que certaines maladies multifactorielles partagent des régions de prédisposition, notamment le diabète de type 1, l'arthrite rhumatoïde et le diabète de type 2 [104], ce qui montre bien que des prédispositions généralistes peuvent entraîner des maladies différentes.

Il est toutefois important de noter que les facteurs génétiques seuls n'expliquent pas le diabète de type 1. Il a en effet été démontré chez l'homme que pour une personne dont le jumeau monozygote présente un DT1, le risque de développer le diabète n'est que de 30 à 50%, ce qui suggère une large part environnementale [105].

## B. Facteurs environnementaux

Les facteurs environnementaux n'ont pas encore pu être tous identifiés et testés mais certaines hypothèses ont été avancées. L'une des plus répandues est l'action de virus. Ces virus agiraient comme un élément déclencheur qui serait responsable de l'auto-réactivité à la base de la destruction des cellules bêta. Plusieurs observations ont déjà prouvé que certains types de virus sont capables d'infecter directement et de détruire les cellules bêtas productrices d'insuline [106]. De plus, les effets cytopathiques, c'est-à-dire les changements morphologiques visibles des cellules bêta lors d'une multiplication virale, pourraient être responsables de leur destruction généralisée, quelques cellules bêta endommagées provoqueraient une réaction spécifique de tout le système immunitaire. Cependant, l'effet

diabétogène des virus pourrait être dû à un autre phénomène. En effet, bien que des cas de diabètes fulgurants provoqués par des virus infectant et lysant directement des cellules bêtas aient été rapportés chez l'humain [107], ils sont peu fréquents. De plus, cet effet n'explique pas l'effet d'auto-réactivités, un effet très important dans le diabète de type 1 [108].

Mais une approche combinant à la fois la génétique et l'environnement semble aussi très intéressante : il semblerait en effet que certaines personnes présenteraient génétiquement une vulnérabilité au niveau du HLA faisant partie du CMH [109] et que chez ces personnes, un diabète pourrait être déclenché par un virus ayant infecté les cellules bêta du pancréas, déclenchant ainsi une réponse du système immunitaire [110].

D'autres pistes sont actuellement à l'étude, par exemple le rôle de l'hygiène sur le déclenchement de cette maladie. On constate une augmentation drastique de la fréquence du diabète dans certains pays industrialisés et en développement [111] comme les Etats-Unis ou la Finlande, où la maladie est devenue un problème de santé publique car non seulement son incidence augmente, mais on constate également des patients de plus en plus jeunes [112]. Plusieurs hypothèses ont été avancées pour tenter d'expliquer ce phénomène, parmi lesquelles l'exposition à des produits chimiques ou à des virus. Cependant cela paraît peu probable car actuellement aucun virus n'a été associé au déclenchement du diabète et il est difficile de comprendre comment ces deux phénomènes pourraient causer cette augmentation globale [113].

En revanche, ces dernières années, les changements de style de vie ont été étudiés comme un potentiel facteur majeur dans l'augmentation de l'incidence de diabète et d'autres maladies auto-immunes, allergiques et malignes [114]. L'hypothèse du rôle de l'hygiène est que le déclin des maladies infectieuses lié à une meilleure hygiène, de meilleurs soins et conditions médicales participe à augmenter les risques de développer ces maladies.

En effet, l'augmentation drastique de la fréquence des diabètes dans certains pays peut s'expliquer par la diminution des infections. Les mécanismes des effets protecteurs des infections contre le diabète de type 1 sont variés et incluent la compétition pour les facteurs homéostatiques et la stimulation des cellules T régulatrices [115].

## V. Etude du diabète de type 1

Le diabète est une maladie complexe, connue pour faire intervenir de nombreux gènes [82], et en ce sens les études de GWAS sont bien adaptées pour essayer d'identifier les gènes impliqués dans sa mise en place. En effet pour de nombreuses maladies complexes cette technique a permis d'identifier un ou plusieurs gènes majeurs [116] [117].

Cependant, malgré ces nouvelles technologies, les maladies multifactorielles comme le diabète restent très difficiles à étudier du fait de l'hétérogénéité génétique/environnement [118]. Pour cette raison, les études sur des modèles animaux suffisamment proches et faciles à standardiser deviennent d'autant plus importantes. Bien qu'il existe également un modèle de rat permettant d'étudier le diabète, le BB (Biobreeding) rat, développant spontanément le diabète de type 1 [119], le modèle le plus couramment utilisé est la souris, notamment la lignée NOD (NonObese diabetic).

### A. Modèle animal

#### 1. La souris Non Obese Diabetic

La souris NOD est une lignée de souris qui développe spontanément un diabète fortement similaire au diabète de type 1 de l'homme. Cette lignée a été caractérisée au laboratoire de recherche Shionogi à Aburahi au Japon par l'équipe du professeur Makino. La maladie se manifeste à partir de 12 semaines d'âge, avec une incidence de 40% chez les mâles et 80% chez les femelles. Jusqu'à peu on ne comprenait pas vraiment pourquoi les femelles développaient aussi fortement le diabète par rapport aux mâles mais des progrès récents ont permis d'améliorer notre compréhension de ce phénomène. Dans un premier temps le taux d'hormones a été soupçonné, d'autant plus que la castration des mâles augmentait l'incidence

de diabète [120]. Cependant des lignées de souris germ-free, vivant dans des environnements contrôlés afin d'éviter tout contact avec des agents viraux, bactériens ou parasites, perdent le biais du sexe face au diabète, ce facteur n'est donc pas suffisant en lui-même. Il semblerait que cette différence de susceptibilité face à la maladie soit en fait due au microbiote, les micro-organismes vivant dans leurs corps, qui diffèrent entre les mâles et femelles [121], le microbiote présent chez les mâles entraînent la production d'hormones différentes de celles des femelle, notamment de la testostérone qui a pour effet supplémentaire de réduire l'inflammation dans les îlots et donc la production d'auto-anticorps par l'intermédiaire de l'activité des récepteurs des androgènes. Cela a été confirmé par des tests de transfert de microbiote du mâle à la femelle réduisant les risques de diabète [122].

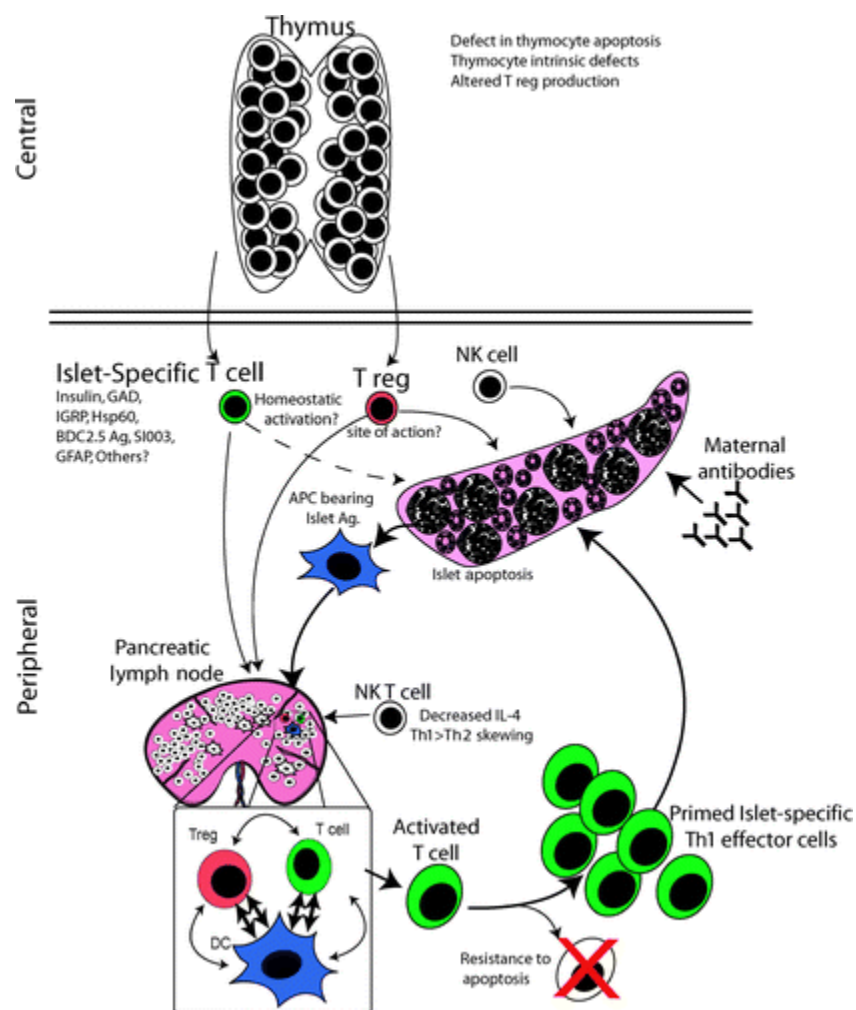
Lors d'une étude sur une maladie présentant ces caractéristiques il est néanmoins préférable de se concentrer sur les femelles afin d'éviter les biais tout en travaillant sur des souris plus soumises au diabète [123].

Une fois devenu disponible pour la recherche, ce modèle d'étude a été très largement adopté et reste une base de l'étude du diabète de type 1. Le modèle murin n'est néanmoins pas sans défaut. En effet bien que de nombreuses manipulations aient démontré empêcher la mise en place d'un diabète de type 1 chez cette souris [124], ce but n'a pas encore été atteint chez l'homme. Cependant, la maladie développée dans le modèle murin possède de nombreuses similitudes avec celle des hommes ce qui justifie l'utilisation de la souris NOD comme outil d'étude. Ces similitudes incluent des antigènes cibles communs, l'expression de molécules du CMH de classe II (comme I-A<sup>g7</sup> et HLA-DQ8) présentant des peptides proches [125] et des polymorphismes génétiques agissant sur des mécanismes communs. En effet, dans de nombreux cas, des découvertes sur le diabète faites sur la souris NOD ont été confirmées chez l'homme. Par exemple, la protéine IGRP, spécifique des cellules bêta des îlots de Langerhans, a tout d'abord été identifiée comme une cible des cellules T CD8<sup>+</sup> auto-réactives dans la



souris NOD [126]. Des travaux ultérieurs menés chez l'homme ont révélé que les peptides IGRP sont également pris pour cible par les cellules T CD8<sup>+</sup> chez les patients diabétiques humains [127]. En plus de la découverte des antigènes, d'autres champs de recherche sur la souris NOD couvrent l'identification de gènes de prédisposition, les tests de traitements thérapeutiques, l'identification de nouvelles cibles et l'analyse de l'influence de l'environnement sur la maladie.

Ce modèle étant très étudié, on connaît maintenant de nombreux mécanismes liés à l'apparition spontanée du diabète chez la souris NOD (**Figure 20**). On sait notamment que des phénomènes de défaut d'apoptose [128] et de production altérée de lymphocytes T régulateurs dans le thymus interviennent, pouvant être à la base des perturbations au niveau des proportions de cellules immunitaires.



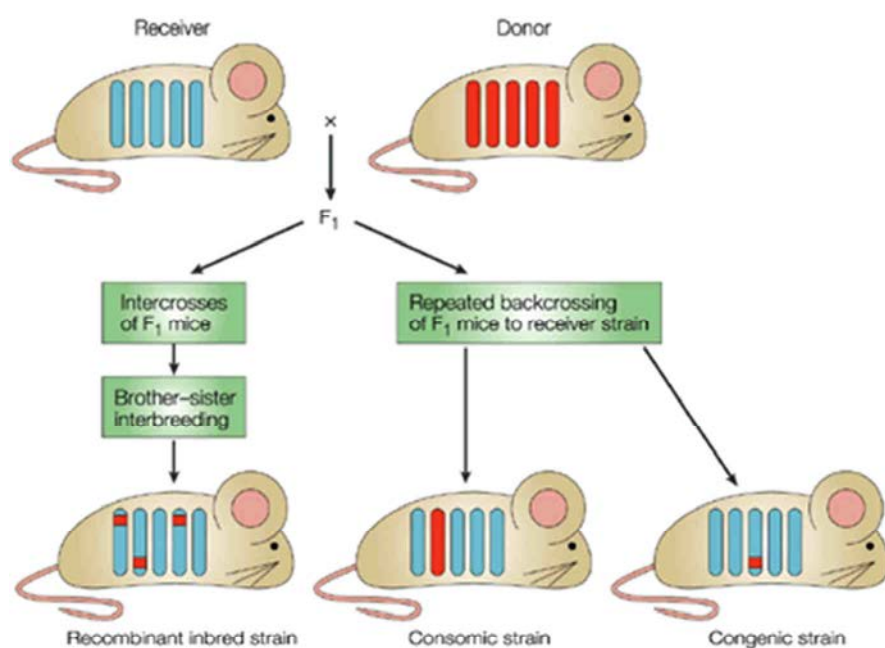
**Figure 20 :** Défauts de la tolérance centrale et périphérique potentiellement impliqués dans le développement du diabète de type 1 chez la souris NOD. L'accent est mis ici sur le rôle potentiel des différentes populations de lymphocytes dans le développement et la progression de la maladie [129].

Ce modèle murin présente beaucoup d'avantages, notamment le fait de pouvoir disposer extrêmement rapidement d'un très grand nombre de sujets dont la maladie est très similaire à celle de l'homme. Cette lignée, de même que beaucoup d'autres, a également été intégralement séquencée et les localisations et fonctions de nombreux gènes sont déjà connues (<http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes/>). Il est, de plus, très facile de contrôler l'environnement de ces animaux, permettant ainsi de se concentrer sur l'aspect génétique de la maladie, et on peut également réaliser des invalidations génétiques ainsi que créer des lignées congéniques.

## 2. Utilisation de lignées congéniques

L'existence de lignées de souris consanguines prédisposées à des maladies comme la lignée NOD pour le diabète de type 1 et leur croisement avec d'autres souches pures résistantes comme C57BL/6 (B6) ou C3H/HeJ (C3H) ont permis de grandes avancées dans l'identification des gènes de prédisposition aux maladies auto-immunes [130].

Les analyses de liaison permettent d'identifier des loci de prédisposition ou de résistance aux phénotypes étudiés, des régions plus ou moins bien définies d'ADN étroitement associées à un caractère quantitatif (QTL), c'est-à-dire une région chromosomique où sont localisés un ou plusieurs gènes à l'origine du caractère en question. Cette technique utilise directement la valeur quantitative du trait phénotypique. Les régions génétiques ainsi identifiées peuvent être confirmées par l'analyse de croisements en retour successifs d'un fragment de chromosome comportant un locus identifié par analyse de liaison d'une souche donneuse sur le fond génétique d'une souche receveuse. Les souris F1, issues du croisement d'une souche receveuse, comme la souris NOD susceptible au diabète de type 1 et d'une souche donneuse, comme les souris C3H non susceptibles au diabète, sont croisées avec une souris de la souche receveuse. Des croisements en retour successifs sont ensuite réalisés pour obtenir le fragment de chromosome désiré de la souche donneuse sur un fond génétique suffisamment proche de la lignée receveuse d'origine provenant de la souche receveuse exception faite du fragment du chromosome désiré. La taille du fragment initialement introduit dans la souche receveuse peut alors être réduite par l'identification de recombinaisons dans la région considérée et la sélection des souris comportant des fragments de plus en plus courts. La comparaison avec des souris témoins ayant un génome 100% donneur, l'analyse des profils d'expression de gènes et l'analyse comparative d'haplotypes permettent d'aboutir à l'identification du ou des gènes candidats (**Figure 21**).



Nature Reviews | Immunology

**Figure 21 :** Représentations simplifiées de la création de différents types de lignées d'étude de souris notamment une lignée congénique (droite) [131].

Dans notre cas, les lignées congéniques ont été utilisées afin d'étudier un QTL isolé situé dans la région d'intérêt *Idd6*. Pour cela, des croisements entre des souris NOD/Lt et des C3H/HeJ (résistantes au diabète) ont été réalisés, suivis par des rétrocroisements entre ces descendants et la lignée receveuse (NOD); il faut environ 10-12 générations pour obtenir une souris présentant un génome à 99,9% NOD mais portant le locus *Idd6* d'une C3H. Cette lignée est appelée NOD.C3H 6.VIII (6.VIII). Elle est utilisée pour étudier l'effet de résistance au diabète apporté par les allèles C3H au locus *Idd6* sur une souris à fond génétique NOD, sensible au diabète [131].

C'est une pratique largement répandue que d'utiliser ce genre de lignées congéniques pour étudier les gènes de susceptibilité à une maladie, chacun des loci identifiés comme liés au diabète chez la souris NOD pouvant comporter un intérêt pour comprendre les mécanismes de façon isolée [132]; on peut citer par exemple les loci *Idd9* et *Idd11* qui ont été identifiés

comme responsable de l'activité diabétogène des cellules T CD4<sup>+</sup> [133], mais aussi le locus *Idd3* contenant le gène *Il-2* pouvant influencer la proportion de lymphocytes T [134], ainsi que les loci *Idd19* et *Idd20* contrôlant la progression de l'insulite, augmentant l'activité suppressive des splénocytes lors d'une expérience de transfert et capables d'interagir avec le locus *Idd6* afin de participer à la régulation du système immunitaire périphérique [135].

### 3. Les lignées « knockout »

Un autre outil à la disposition des chercheurs pour comprendre le rôle d'un gène lié à une maladie est de réaliser un knockout (KO), c'est-à-dire une invalidation de ce gène afin de comparer les effets par rapport au contrôle sans le KO. Pour cela on peut utiliser la technique d'invalidation d'un gène qui se base sur la recombinaison homologue permettant de remplacer un gène complet, présent dans le génome de l'organisme, par une version suffisamment modifiée pour qu'il ne s'exprime pas, ainsi que, dans certains cas, par un autre gène dit rapporteur, ce qui permet de suivre l'activité du promoteur. La première étape consiste donc en la construction d'un vecteur portant le gène invalidé, par exemple dans un plasmide bactérien, ce vecteur est ensuite introduit dans des cellules ES (Souches Embryonnaires). On utilise des cellules ES car ces cellules sont capables de se différencier en une très grande variété de cellules différentes : elles sont pluripotentes. Il faut alors sélectionner un clone de cellules ES ayant effectivement reçu le vecteur, et ayant procédé à la recombinaison homologue. Une des deux copies d'un gène autosomal est ainsi invalidée dans leur génome. La deuxième étape consiste en l'obtention d'animaux génétiquement modifiés. Pour cela, on procède à l'injection de quelques cellules ES modifiées dans le blastocœle (cavité) de blastocytes de souris. Ces cellules s'intègrent naturellement à la Masse Cellulaire Interne (MCI), un ensemble de cellules dont dérivent toutes les cellules du futur organisme. Les embryons ayant reçu ces cellules ES sont alors réimplantés dans des mères porteuses. On

obtient ainsi, à la naissance, des souris "chimériques", dont les tissus dérivent en partie de cellules ES modifiées. Parmi ces individus, il est alors nécessaire de sélectionner ceux dont les cellules de la lignée germinale dérivent de cellules ES : eux seuls seront capables de transmettre le gène invalidé à leur descendance. A partir du moment où l'on dispose de tels individus, la troisième étape consiste en un croisement entre ces souris et des souris "sauvages", c'est à dire possédant le gène normal, non modifié. Ce croisement permet d'obtenir des souris hétérozygotes, possédant un allèle sauvage, et un allèle invalidé. La dernière étape consiste alors à croiser ces souris hétérozygotes entre elles pour obtenir des souris homozygotes dans une proportion de 25%, possédant deux copies du gène invalidé et donc, logiquement, aucune copie du gène fonctionnel [136].

C'est grâce au potentiel de ces lignées KO que le projet KOMP (Knockout Mouse Project), réalisé par le NIH (National Institutes of Health) a été mis en place. Globalement, les objectifs de ce projet sont 1) d'utiliser le ciblage de gène pour développer une inactivation spécifique pour un maximum de gènes dans la lignée C57BL/6, 2) mettre en place une banque de données pour abriter les produits de cette ressource ainsi que créer un maximum de souris KO encore indisponibles, 3) développer des cellules ES C57BL/6 qui montrent une transmission robuste en lignée germinale afin qu'elles puissent être utilisées avec un débit suffisant 4) créer un centre de coordination des données qui mettra à jour le statut des données pour la communauté de chercheurs [137].

Afin d'inactiver un gène on peut également utiliser la technologie des TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) [138] [139], il s'agit d'enzymes de restriction artificielles générées par fusion d'un domaine de liaison à l'ADN, appelé TALE (Transcription Activator-Like Effectors), avec un domaine ayant la capacité de cliver l'ADN. La combinaison de ces deux aspects permet de créer artificiellement des enzymes de restrictions spécifiques pour une séquence d'ADN choisie. On peut alors choisir d'insérer ces constructions spécifiques dans

des plasmides utilisés pour transfecter les cellules cibles. Ces cellules vont donc exprimer les protéines TALEN, qui vont pénétrer dans le noyau et, par leur action d'enzymes de restriction, cliver la zone préalablement sélectionnée. Comme cette action est double brin, la réparation de l'ADN va se faire de façon non-homologue et le gène choisi a donc de grandes chances d'être invalidé, notamment en cas d'insertion/délétion ou de décalage du cadre de lecture. Il est également possible d'injecter les TALEN sous forme d'ARNm ce qui élimine la possibilité d'une intégration génomique du gène codant pour la TALEN. En l'occurrence les cellules choisies sont des embryons de souris au stade 1 cellule. Il faut alors tester les individus issus de ces croisements pour trouver lesquels montrent une inactivation du gène visé pour lancer des croisements et disposer d'une lignée complète avec une inactivation du gène cible [140] [141].

Plus récemment, une nouvelle technique a été mise en place : les CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). Cette technologie également appelée CRISPR-Cas9 (CRISPR associated protein 9) repose sur une nucléase guidée par ARN impliquée dans l'immunité adaptative des bactéries et les lignées archaées [142] [143] [144]. La nucléase Cas9, la plus utilisée actuellement, est guidée par un ARN programmable appelé Single Guide RNA (sgRNA) [145, 146]. Le complexe Cas9/sgRNA reconnaît la séquence complémentaire de 20 nucléotides possédant en aval une séquence PAM (Protospacer-Adjacent Motif). Les protéines Cas9 de différentes bactéries reconnaissent différentes séquences PAM, par exemple la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* reconnaît les séquences PAM « NGG » et « NAG » [147]. La Cas9 coupe approximativement 3 nucléotides en amont de la séquence PAM et induit une coupure double brin de l'ADN. Ces coupures sont alors réparées par les mécanismes de réparation de l'ADN endommagé soit par le système de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ : non-homologous end-joining) qui est sujet aux

erreurs et induit de petites insertions et délétions, soit par la voie de réparation homologue dirigée (HDR) qui peut être utilisée pour recombinaison les marqueurs sélectionnés à des sites spécifiques dans le génome. Ce système peut donc être utilisé pour réaliser des modèles de souris knockout ou knock-in [148] [149], les ARN guides simples sont facilement conçus et peuvent être exprimés avec la nucléase Cas9 dans le même vecteur pour cibler des sites spécifiques de l'ADN pour la modification du génome.

C'est grâce à l'utilisation de ces techniques, notamment dans un premier temps grâce aux lignées congéniques que nous avons pu travailler sur un intervalle identifié par les études de QTL précédentes, le locus *Idd6*.

### B. Le locus *Idd6*

Le déclenchement d'une maladie auto-immune dépend de l'interaction de loci de prédisposition et de résistance avec des facteurs environnementaux. Un aspect des maladies multifactorielles est l'interaction des loci de prédisposition entre eux par épistasie. Ceci est illustré par les loci *Idd20*, *Idd19* et *Idd6* sur le chromosome 6 de la souris NOD.

De façon générale, l'analyse de souches NOD congéniques pour un fragment de chromosome 6 murin d'origine C3H/HeJ a montré que le chromosome 6 murin distal présente au moins 3 gènes de prédisposition au diabète de type 1 qui interagissent pour moduler l'incidence cumulative du diabète spontané et induit par injection de cyclophosphamide [150] .

En effet, l'analyse de QTL dans le but d'identifier des gènes liés à une maladie a depuis longtemps fait ses preuves. Une étude réalisée en 1995 a utilisé cette technique pour identifier les gènes intervenant dans la résistance à l'apoptose des thymocytes. Par comparaison entre les polymorphismes des microsatellites entre les lignées C57BL/6 et NOD, une région

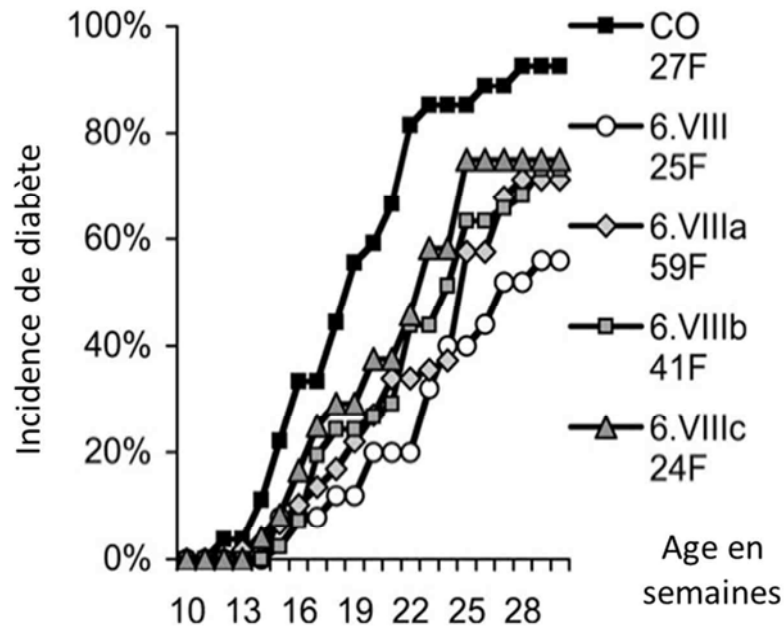


chromosomique a été associée à cette différence et cette région contenait le locus de susceptibilité au DT1 d'*Idd6* [151].

Depuis de nombreuses études ont confirmé l'importance de ce locus *Idd6* sur une maladie auto-immune comme le diabète car outre la confirmation du fait que cette région contient un facteur responsable de la résistance à l'apoptose des lymphocytes de la souris NOD [152] [153], il a aussi été prouvé que cette région est responsable du contrôle de la prolifération des lymphocytes T [154], vraisemblablement par l'intermédiaire du gène Toll-Like Receptor 1 (*Tlr1*) [155], mais également dans l'activité suppressive des lymphocytes Treg [156].

La lignée à l'origine de cette étude : 6.VIII a déjà été caractérisée, elle a permis de mettre en évidence ce locus de 5.8 Mb situé en position distale sur le chromosome 6 de la souris. Sur fond génétique NOD, les allèles C3H au locus *Idd6* confèrent une résistance au diabète, tandis que les allèles NOD sont associés à une susceptibilité au diabète [135]. Pour identifier le ou les gènes responsables de cette variation de phénotype, différentes lignées sous-congéniques ont été réalisées, en effet la lignée 6.VIII présente des caractéristiques très intéressantes mais 5.8 Mb représentent un locus beaucoup trop grand pour tenter d'identifier un gène candidat, les lignées sous-congéniques ont été réalisées afin de réduire la taille du fragment C3H en croisant à nouveau cette lignée avec la souris NOD et donc faciliter les recherches.

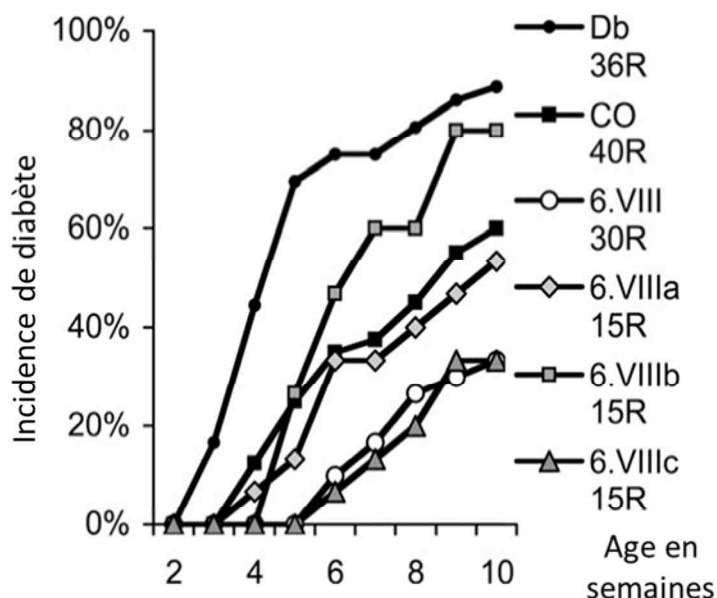
Dans un premier temps les susceptibilités au diabète des premières lignées disponibles (NOD.C3H 6.VIIIa, b et c) ont été analysées (**Figure 22**). Il a alors été observé que les trois lignées montraient un phénotype intermédiaire, c'est-à-dire moins de diabètes spontanés que la lignée NOD mais plus que la lignée 6.VIII.



**Figure 22 :** Incidence du diabète pour les différentes lignées étudiées. Les trois lignées: sous-congéniques : 6.VIIIa, b et c, présentent une incidence intermédiaire entre le contrôle CO (allèle NOD au locus *Idd6*) et le témoin 6.VIII (allèle C3H au locus *Idd6*). Les valeurs p sont  $<0.0001$  pour 6.VIII,  $<0.0001$  pour 6.VIIIa, 0.01 pour 6.VIIIb et 0.026 pour 6.VIIIc par comparaison avec le contrôle CO ; (F=Femelles)

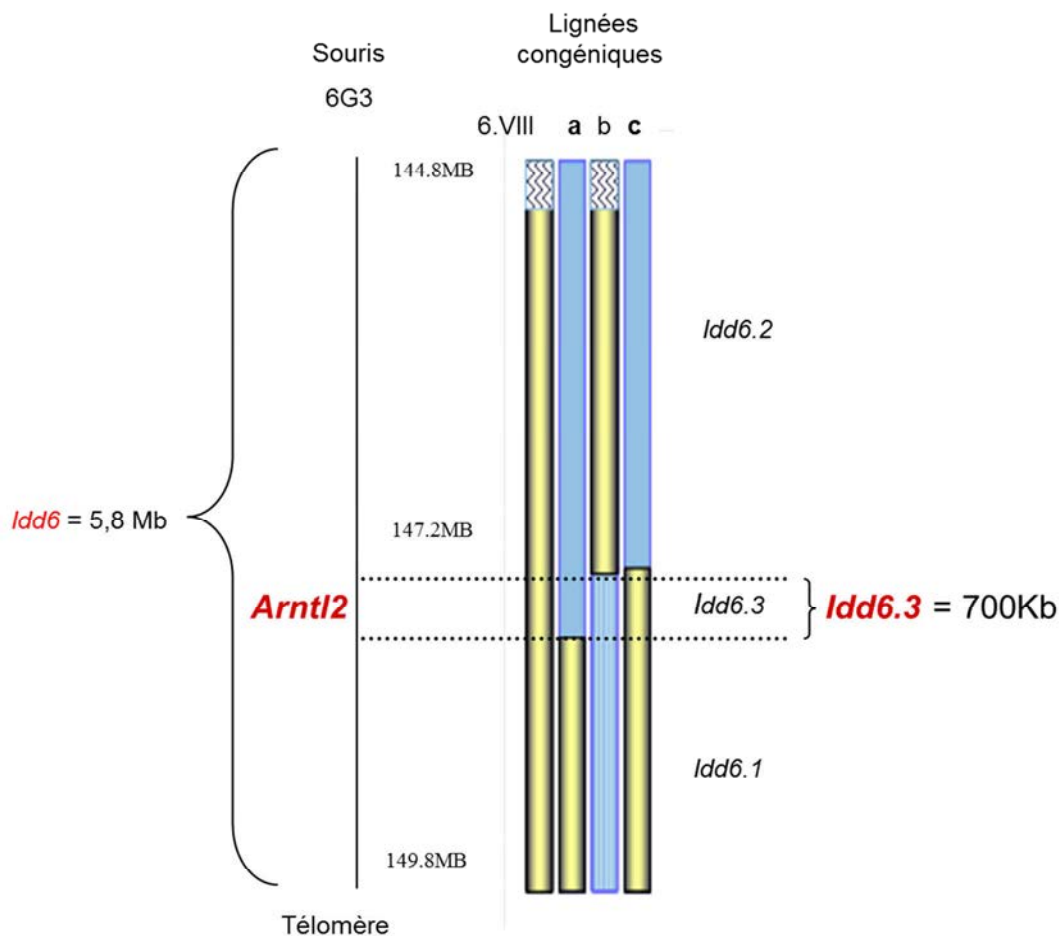
Une autre technique visant à phénotyper les lignées de souris est le co-transfert de splénocytes, c'est à dire des cellules immunitaires de la rate. Cette technique [157] consiste à injecter les splénocytes de souris diabétiques, ces cellules induisant un diabète, avec des splénocytes des différentes lignées congéniques NOD.C3H à des souris NOD/SCID, c'est-à-dire des souris NOD dépourvues de lymphocytes T et B (**Figure 23**). L'injection de splénocytes NOD induit normalement un diabète à 100% mais le fait d'ajouter les splénocytes d'une autre lignée peut apporter une protection dépendant de cette lignée. On peut donc caractériser les lignées en fonction de cette activité suppressive des splénocytes. Les splénocytes issus de la lignée 6.VIIIc induisent une protection contre le diabète se rapprochant de celle observée pour la lignée 6.VIII tandis que les splénocytes des lignées 6.VIIIa et 6.VIIIb montrent une protection bien moins importante ; on peut en déduire que la lignée

6.VIIIc a reçu par recombinaison des allèles C3H intervenant dans la sensibilité au diabète non-portés ou incomplets dans les lignées a et b.



**Figure 23 :** Incidence de diabète chez des souris NOD/SCID auxquelles on a injecté des splénocytes des lignées étudiées en plus de splénocytes NOD diabétogènes. On peut constater que les cellules de la lignée 6.VIIIc apportent une protection équivalente à celle de la lignée 6.VIII, bien supérieure à celles apportées par les lignées 6.VIIIa et 6.VIIIb. Les valeurs p sont : 0.012 pour 6.VIII, 0.568 pour 6.VIIIa, 0.339 pour 6.VIIIb et 0.048 pour 6.VIIIc comparés au contrôle CO, <0.0001 pour CO comparé aux splénocytes diabétogènes (Db). R, receveuses.

On peut constater que les splénocytes de la lignée 6.VIIIc apportent une meilleure protection contre le diabète que les deux autres lignées sous-congéniques, la région de 700 Kb (nommée *Idd6.3*) provenant du parent C3H, uniquement présente chez cette lignée, semble donc contenir un ou plusieurs gènes influant sur la protection au diabète. L'étude d'*Idd6.3* a été ensuite effectuée par analyse de l'ensemble des transcrits de la région (**Figure 24**). Parmi la dizaine de gènes présents dans cette région, l'un d'entre eux semble être un candidat très intéressant : *Arntl2* [158]. En effet ce gène présentait une différence d'expression et un polymorphisme entre les allèles NOD et C3H contrairement aux neuf autres gènes.



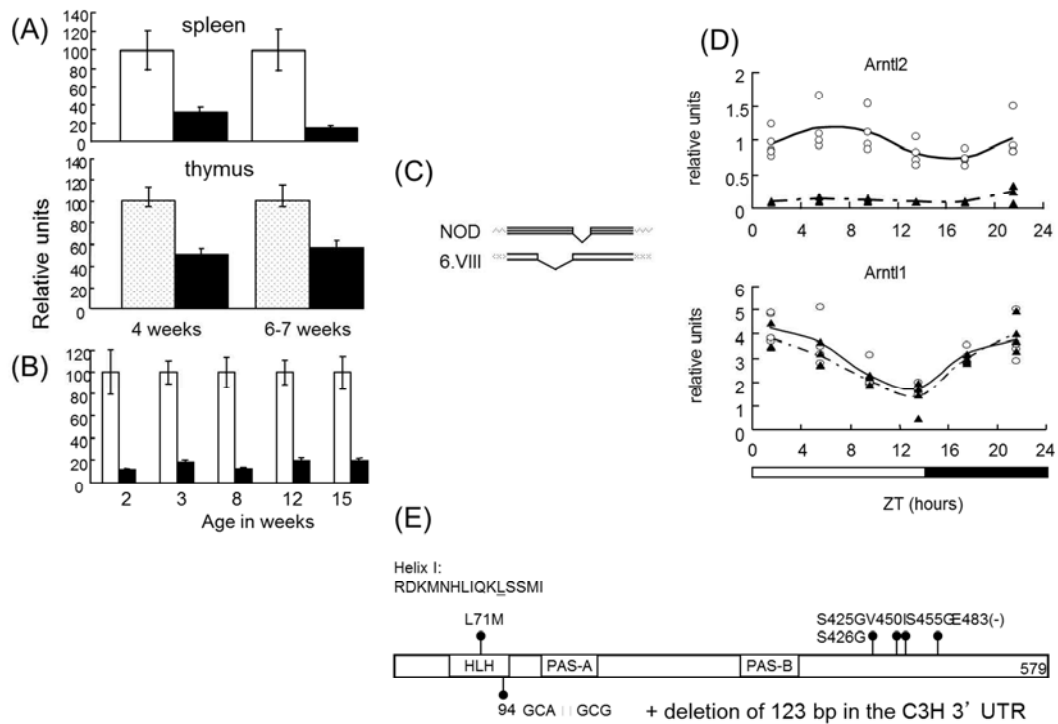
**Figure 24 :** Tous les gènes présents dans la région *Idd6* ont été étudiés pour leur niveau d'expression dans les splénocytes de la souris NOD et de la souris congénique 6.VIII. Parmi les 10 gènes présents dans la région *Idd6.3*, l'allèle C3H du gène *Arntl2* présentait une plus forte expression que l'allèle NOD. De nombreux polymorphismes ont également été identifiés, faisant de lui un très bon candidat d'étude.

### C. Le gène *Arntl2* (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2)

#### 1. *Arntl2* : un candidat du diabète de type 1

Bien que la région ressortant de ces analyses (*Idd6.3*) contienne 10 transcrits, seul le gène *Arntl2* (ou *Bmal2*) membre de la famille des gènes codant pour des facteurs de transcription bHLH-PAS, dont plusieurs membres participent à la régulation du rythme circadien, a montré une différence d'expression dans la lignée protégée contre le DT1 : 6.VIII. *Arntl2* contient de

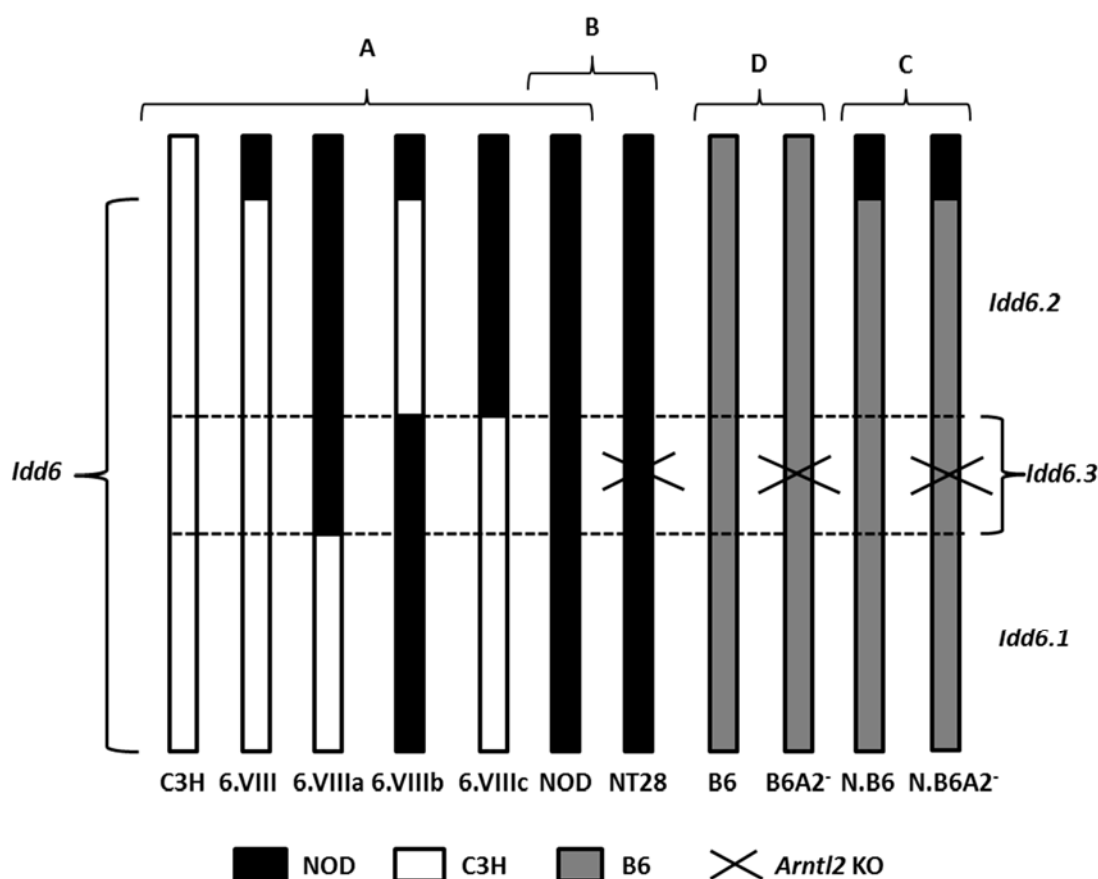
nombreux polymorphismes NOD/C3H dans les séquences 5'-UTR, exonique et 3'-UTR de ses transcrits. Plusieurs de ces polymorphismes entraînent des variations dans les domaines fonctionnels de ce facteur de transcription et sont soupçonnés d'influencer sa dimérisation, son activité transcriptionnelle et/ou sa spécificité. De plus, des formes alternatives d'épissage spécifiques aux lignées ont été identifiées (**Figure 25**) [158].



**Figure 25 :** *Arntl2* dans la souris NOD: diminution de l'expression d'*Arntl2* dans la rate (A,B) et dans le thymus (A) des lignées congéniques *Idd6*, (C) épissage alternatif, (D) diminution d'expression dans la lignée NOD (E) Polymorphismes C3H versus NOD

Dans un premier temps nous avons utilisé les lignées 6.VIIIa et 6.VIIIc pour étudier les modifications au sein de ses lignées entraînées par une variation d'allèle (NOD ou C3H) d'*Arntl2*. Mais, par la suite nous avons mis au point d'autres lignées de souris : la lignée N.B6A2<sup>-</sup> particulièrement utile car cette lignée réalisée sur fond NOD possède un locus *Idd6* B6 avec une inactivation du gène *Arntl2*, qui permet de se concentrer exclusivement sur les effets de ce gène par comparaison avec sa lignée congénique contrôle : N.B6. Nous avons

aussi utilisé une autre lignée porteuse d'un gène *Arntl2* invalidé mais cette fois sur un fond C57BL/6, la lignée B6A2<sup>-</sup> comparée à la lignée B6 elle-même, afin de vérifier si le gène *Arntl2* possède une action indépendamment du fond génétique NOD. Ainsi qu'une lignée créée grâce à la technique des TALEN : NT28, également sur fond génétique NOD qui porte également une inactivation d'*Arntl2*, cette lignée a notamment été utilisée par comparaison avec la lignée NOD afin de tester si une version muette du gène va apporter des modifications de phénotype par rapport à la version NOD dont on ne connaît pas l'efficacité (**Figure 26**).



**Figure 26 :** Les différentes lignées de souris utilisées lors de nos tests:

A: lignées congéniques utilisées afin de caractériser les régions *Idd6.1*, *Idd6.2* et *Idd6.3*, les lignées les plus utilisées étant 6.VIIIa et 6.VIIIc différant seulement par *Idd6.3* (contenant le gène *Arntl2*)

B: La lignée NT28 sur fond génétique NOD portant un gène *Arntl2* muté permet de tester les différences entre un allèle NOD d'*Arntl2* comparé à son inactivation

C: Lignées permettant l'analyse de l'effet de l'inactivation d'*Arntl2* dans une lignée sur fond génétique NOD avec un *Idd6* B6

D: Lignées permettant l'analyse de l'effet de l'inactivation d'*Arntl2* dans une lignée B6

*Arntl2* apparaissait donc comme un bon candidat potentiel dans la susceptibilité au DT1, cependant pour comprendre comment ce gène peut influencer sur cette maladie il convient de connaître son mode de fonctionnement en tant que facteur de transcription lié au rythme circadien.

## 2. *Arntl2*, un gène de contrôle du rythme circadien

Ce gène code pour un facteur de transcription lié au rythme circadien, également retrouvé chez l'homme. Il est appelé ainsi à cause de son homologie avec l'*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (Arnt)*, gène impliqué dans la tolérance au glucose et dans la sécrétion d'insuline et associé au DT2 [159] [160].

### a) L'horloge centrale : le noyau suprachiasmatique (NSC)

Le terme circadien vient du latin *circa* signifiant « environ » ou « approximativement » ou « pendant » et *diem* ou *dies* signifiant « jour ». Un rythme circadien est un processus biologique qui présente une oscillation endogène de 24 heures. L'étude formelle des rythmes biologiques, journaliers, hebdomadaires, saisonniers ou annuels est appelée chronobiologie [161].

L'horloge circadienne centrale chez les mammifères est localisée dans le noyau suprachiasmatique (NSC), localisé dans l'hypothalamus. La destruction du NSC entraîne l'absence totale de rythme veille/sommeil régulier. Bien que les rythmes circadiens soient endogènes, ils sont ajustés à l'environnement local par des signaux externes appelés *zeitgebers*, celui considéré comme le plus important étant la lumière du jour. Beaucoup de composants génétiques de l'horloge circadienne sont encore inconnus. Leurs interactions

créent une boucle de contrôle de gènes résultant en fluctuations périodiques de leur expression que les cellules du corps interprètent selon des périodes spécifiques de la journée [162].

Le NSC reçoit l'information de la luminosité par les yeux, la rétine contenant des photorécepteurs. Mais la rétine contient également des cellules ganglionnaires photosensibles spécialisées projetant directement sur le NSC où elles participent à l'élaboration de l'horloge circadienne principale. Ces cellules contiennent des photopigments mélanopsine et leurs axones constituent la voie retinohypothalamique, aboutissant au NSC. Si les cellules du NSC sont prélevées et mises en culture, elles maintiennent leur propre rythme en l'absence de signaux [163].

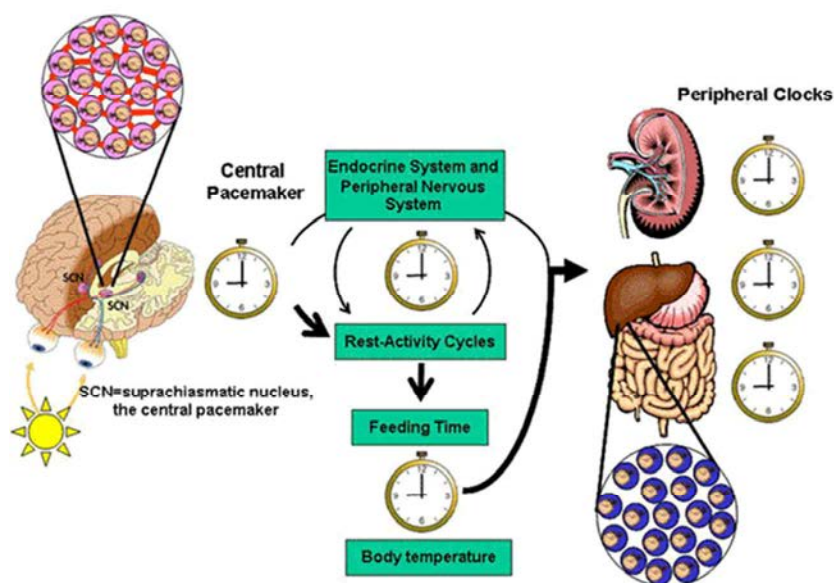
On sait à présent que l'horloge circadienne moléculaire peut fonctionner à l'intérieur d'une cellule isolée de manière autonome. Et dans le même temps, différentes cellules peuvent communiquer les unes avec les autres entraînant une coordination de leurs signaux. Ce système peut interagir avec les glandes endocrines afin de relâcher des hormones de manière périodique. Les récepteurs de ces hormones peuvent être localisés à l'autre bout du corps et néanmoins synchroniser les horloges périphériques de divers organes. C'est de cette façon que la synchronisation de, par exemple, la température du corps, le cycle veille/sommeil, la soif et l'appétit sont coordonnés voire même contrôlés par l'horloge biologique [164].

Le rythme est lié au cycle jour/nuit, les animaux (y compris les humains) maintenus dans l'obscurité totale pendant de longues périodes finissent par développer un rythme « freerunning ». Leurs cycles de sommeil sont décalés un peu plus tôt ou plus tard chaque « jour » selon que leur période endogène est plus ou moins longue que 24 heures. Cependant le NSC n'est pas le seul acteur des rythmes circadiens, il existe également des contrôles périphériques.



## b) Les oscillateurs périphériques

L'un des effets encore incompris en matière de rythmes circadiens est la relation entre les contrôles centraux et périphériques. Malgré une amélioration des connaissances sur les mécanismes des rythmes circadiens et de leur maintien, la façon dont ils contrôlent la physiologie circadienne et l'expression des gènes est encore loin d'être parfaitement comprise. La signalisation entre l'oscillateur central et les horloges périphériques met probablement en jeu un ensemble de communications hormonales directes tels que les glucocorticoïdes et indirectes tels que la température corporelle, qui s'avère être cyclique, et le métabolisme alimentaire [165]. Bien que chacune de ces voies de signalisation puisse entraîner un décalage de phase des oscillateurs périphériques sans affecter l'horloge centrale du NSC, l'élimination du rythme circadien dans n'importe lequel de ces signaux n'entraîne pas la perte de l'expression des gènes circadiens (**Figure 27**).



**Figure 27 :** Les gènes de l'horloge sont exprimés non seulement dans les SCN mais aussi dans d'autres parties du cerveau, le foie, le muscle, le rein et plusieurs autres tissus. Et tout comme dans les SCN, l'expression des gènes de l'horloge sont rythmiques. Cependant, on observe que ces oscillations sont généralement retardées par rapport aux oscillations à celles observées dans le SCN et sont parfois amorties lorsque les tissus sont déconnectés du SCN. Cela suggère que ces oscillateurs périphériques sont sous le contrôle de l'oscillateur central du SCN. De plus, d'autres facteurs comme la nutrition ou l'activité peuvent influencer les horloges périphériques.

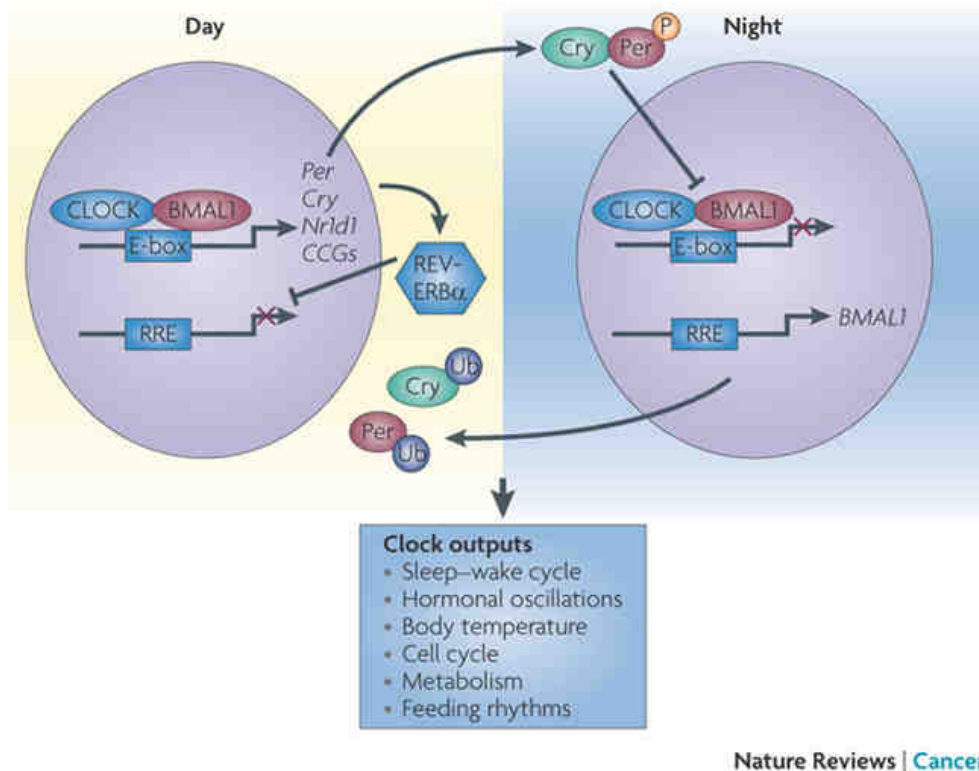
Les études récentes ont même remis en cause la hiérarchie entre l'oscillateur central et les horloges périphériques. Par exemple l'expression du gène horloge *Per1* peut être directement induite par la glande surrénale via la lumière dans un mécanisme dépendant du NSC. Un système nerveux sympathique intact est essentiel dans ce processus [166]. Des dérégulations de l'horloge de façon tissu spécifique ont confirmé l'existence de tels circuits.

Ceci est très intéressant dans le cadre d'une étude réalisée sur l'obésité et le diabète car ces pathologies sont associées au style de vie et à certains facteurs génétiques. Parmi ces facteurs, la perturbation de l'horloge circadienne et / ou le décalage avec l'environnement jouent un rôle important dans le développement de troubles métaboliques, comme par exemple le contrôle de la production de l'insuline [167] [168].

### c) Les gènes de régulations de l'horloge biologique

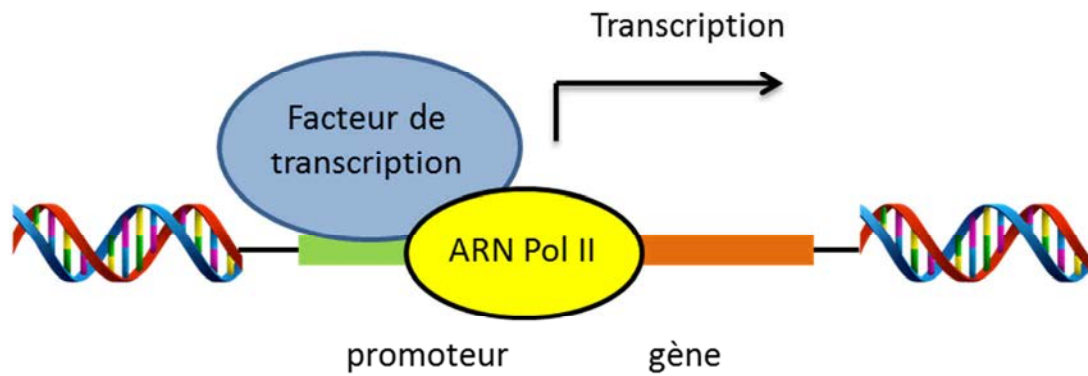
Les phénomènes biologiques circadiens sont reconnus depuis des siècles, mais leurs mécanismes physiologiques et biochimiques ne sont pas encore parfaitement compris. En 1972, une étude a démontré que le noyau suprachiasmatique, qui se situe juste au-dessus des nerfs optiques, est requis pour les rythmes journaliers du comportement animal [169].

Des études génétiques ont depuis identifié de nombreux gènes qui régulent le comportement rythmique de phénomènes biologiques, et des analyses biochimiques des protéines exprimées par ces gènes ont mené au modèle actuel de l'horloge circadienne. Cette horloge est un oscillateur moléculaire basé sur une boucle de feedback négatif dans laquelle les facteurs de transcription CLOCK et BMAL1 travaillent en dimère pour induire l'expression de nombreux gènes, y compris leurs propres inhibiteurs : les protéines period (PER1, PER2 et PER3) et les cryptochromes (CRY1 et CRY2) (**Figure 28**) [170] [171].



**Figure 28 :** CLOCK et BMAL1 amplifient la transcription des gènes *Period* (*Per*) et *Cryptochrome* (*Cry*) pendant la journée. Les niveaux de PER et CRY augmentent durant la nuit, après quoi ils dimérisent et rentrent dans le noyau pour inhiber la transcription de *Clock* et *Bmal1*. Les protéines PER et CRY sont alors dégradés pour initier un nouveau cycle circadien. Dans le même temps, le niveau de la protéine REV-ERB $\alpha$  (encodé par *Nr1d1*) est élevé durant la journée et inhibe la transcription de *Bmal1*. La nuit, le niveau de REV-ERB $\alpha$  est bas, permettant à la transcription de BMAL1 de s'effectuer. P, phosphorylation; RRE, REV-ERB/ROR response elements; Ub, ubiquitylation. [171]

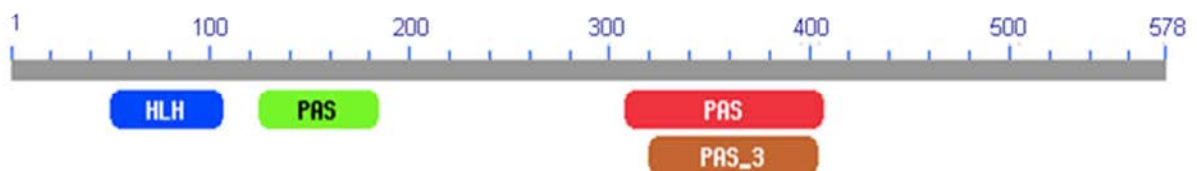
Ces facteurs sont des facteurs de transcription, en biologie moléculaire et en génétique, il s'agit d'une protéine (parfois également appelé un facteur de liaison à l'ADN spécifique à la séquence) qui se lie à une ou plusieurs séquences d'ADN spécifiques, et par cette liaison contrôle le niveau ou même l'activation de la transcription de l'information génétique de l'ADN à l'ARN messager. Un facteur de transcription remplit son rôle seul ou en formant un complexe avec d'autres protéines, afin de promouvoir (en tant qu'activateur) ou bloquer (en tant que répresseur) le recrutement de l'ARN polymérase (l'enzyme réalisant la transcription de l'information génétique de l'ADN à l'ARN) sur le ou les gènes spécifiques (**Figure 29**).



**Figure 29 :** Les facteurs de transcription sont des activateurs ou des répresseurs du complexe transcriptionnel constitué autour de l'ARN polymérase qui agissent en se fixant sur les séquences régulatrices en amont des gènes à transcrire.

Une particularité des facteurs de transcription est qu'ils contiennent toujours au moins un domaine de liaison à l'ADN (DNA-Binding Domain : DBD), qui peut se fixer à une ou plusieurs séquences spécifiques de l'ADN adjacent aux gènes qu'il régule [172]. D'autres types de protéines tels que les co-activateurs, les remodeleurs de chromatine, les histones acétylase, désacétylase, kinase et méthylase, jouent également des rôles cruciaux dans la régulation des gènes [173].

En tant que facteur de transcription, ARNTL2 possède des domaines de fixation à l'ADN lui permettant de remplir ses fonctions de contrôle de l'expression des gènes (**Figure 30**).



**Figure 30 :** Représentation schématique de la protéine ARNTL2 (578 acides aminés). Les domaines HLH (Helix-Loop-Helix) et PAS (PER-ARNT-SIM) sont responsables d'interactions avec l'ADN ainsi que de dimérisation et sont caractéristiques de cette famille de facteurs de transcription.

L'une des particularités des facteurs de transcription, notamment de ceux impliqués dans la régulation du rythme circadien, est le fait qu'ils s'associent souvent en dimères pour agir, on peut citer par exemple CLOCK et BMAL1. On sait d'ailleurs qu'ARNTL2 peut également dimériser avec CLOCK [174].

ARNT dimérise avec AHR, encodé par le gène *AhR* (*Aryl hydrocarbon Receptor*), un facteur de transcription influant sur la régulation du système immunitaire [175].

*Arntl2* présente également une forte homologie avec l'*Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 1* (*Arntl1*), dont la protéine dimérise avec la protéine CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput). CLOCK et BMAL1 sont impliquées dans la régulation de la transcription liée au rythme circadien [176].

#### d) Le rôle des rythmes circadiens dans le diabète

Il y a de plus en plus de preuves de l'implication du rythme circadien dans le développement du diabète [177]. Les études chez la souris ont montré que les perturbations du rythme circadien peuvent accélérer le diabète ainsi que la destruction des cellules [178].

La transcription et la traduction des gènes liés au rythme circadien : Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 1 (ARNTL1), Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2 (ARNTL2), Period circadian proteins (PER1, PER2, PER3) et Cryptochromes (CRY1 and CRY2) jouent un rôle majeur dans la genèse du rythme circadien.

La relation directe entre les gènes liés à l'horloge et le diabète de type 1 a déjà été démontré [179]. Le gène codant le facteur de transcription ARNTL1 a été génétiquement lié au diabète de type 2 chez l'homme [180]. Les souris portant des gènes *Arntl1* et *Clock* inactivés ont permis de montrer que l'horloge des cellules bêta joue un rôle dans la coordination de la sécrétion d'insuline avec le cycle veille/sommeil, et également que la perte du rythme

pancréatique peut déclencher un diabète [181]. Le gène circadien majeur *Arntl1* a également été associé au diabète gestationnel [182]. CRY1 et CRY2, d'autres composants de l'horloge circadienne sont nécessaires pour la régulation des cytokines inflammatoires via la voie du NF-kappaB [183]. L'absence de ces gènes clés de l'horloge entraîne une activation de ce système de signalisation ce qui augmente le taux de molécules inflammatoires. Une inflammation faible constante pourrait contribuer au développement de maladies chroniques comme le diabète. Parmi les autres exemples de l'implication des gènes liés à l'horloge on trouve aussi le polymorphisme de taille de PER3 découvert chez les patients présentant un diabète de type 2 [184].

D'autres gènes homologues de la famille des facteurs de transcription helix-loop-helix, tels que le gène *AhR* (Aryl hydrocarbon receptor) codant pour le récepteur à la dioxine [185] et *Arnt* [159] ont aussi été associés au diabète. *AhR* est un facteur de transcription cytosolique qui est normalement inactive, lié à des protéines chaperonnes. De par leur liaison avec leur ligand, la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD), les chaperonnes se dissocient, ce qui induit la translocation d'AHR dans le noyau où il va dimériser avec ARNT (AhR nuclear translocator), entraînant des changements de transcription de gènes. L'activation d'AHR semble jouer un rôle dans le développement des cellules T régulatrices et T effectrice Th17 [186, 187].

De plus il a été prouvé que l'activation d'AhR par des injections de dioxine (TCDD) protège les souris NOD contre le diabète et augmente la proportion de cellules T Foxp3(+) dans les ganglions périphériques (PLN) [185].

#### i. Rythme circadien et production d'insuline

Le pancréas est un organe constitué de nombreux types de cellules possédant plusieurs rôles, parmi elles certaines régulent les métabolismes du sucre et des graisses par la production contrôlée d'enzymes et d'hormones digestives en réponse à une prise de nourriture et aux demandes physiologiques. Par exemple, pour maintenir des taux de glucose normaux après un repas, les cellules bêta des îlots du pancréas produisent de l'insuline, qui stimule la rentrée et le stockage du glucose dans les cellules musculaires et adipeuses, et arrête la production et la sécrétion de glucose par le foie. Il est de plus en plus clair que l'horloge circadienne contrôle ces processus. Les îlots du pancréas montrent des rythmes circadiens qui contrôlent la sécrétion d'insuline, et il a été démontré qu'une perturbation de ces rythmes entraîne une très forte augmentation du glucose dans le sang à cause d'une perturbation de la sécrétion d'insuline [181].

Deux séries de mécanismes suggèrent que les horloges moléculaires chez les mammifères participent à la régulation métabolique. Premièrement, l'expression des enzymes, des transporteurs et des récepteurs qui régulent le métabolisme varie très fortement pendant la journée [188]. Deuxièmement, les rythmes circadiens en dehors du noyau suprachiasmatique sont ajustés par rapport à la nutrition plutôt que sur le cycle jour/nuit [189] [190].

Les perturbations des gènes de l'horloge circadienne affectent en général profondément non seulement l'activité locomotrice mais aussi le comportement alimentaire et ainsi peuvent indirectement modifier le métabolisme. Ces perturbations peuvent être contrées par une inactivation spécifique de gènes tels que *Bmal1* dans le ou les organes concernés, ce qui laisse en général le modèle de comportement intact. Ces observations tendent à prouver un rôle pour les gènes circadiens des mammifères à l'extérieur du cerveau en prédiction des changements quotidiens récurrents dans la demande métabolique [191], pouvant mener à une augmentation de la production de glucose par le foie pendant les périodes escomptées d'alimentation.

Il a été démontré [181] que le pancréas de la souris abrite une horloge circadienne, en effet les îlots du pancréas présenteraient des rythmes fortement maintenus même en dehors de leurs tissus environnants. Ces rythmes dans les îlots semblent fonctionner de la même façon et avec les mêmes composants que d'autres rythmes chez les mammifères et instaurer une expression par cycles de gènes impliqués dans la détection de l'insuline, du glucose et la prolifération et le développement des îlots eux-mêmes. Ces rythmes semblent être indispensables pour les besoins métaboliques spécifiques et le bon fonctionnement des îlots pancréatiques [192].

Une partie de cette régulation métabolique semble passer par l'action du gène *Bmal1*, son inactivation entraînant des perturbations métaboliques chez les souris, néanmoins en cas de surexpression de *Bmal2* chez ces mêmes souris on observe une correction du phénomène, prouvant que *Bmal2* peut remplacer *Bmal1* dans son rôle métabolique [193].

## ii. Les rythmes circadiens dans le contrôle du système immunitaire

Des études réalisées dans les années 60 et 70 ont déjà démontrés que la réaction du système immunitaire vis à vis des pathogènes suit un rythme circadien [194]. Ces études ont aussi démontré que certains types spécifiques de cellules immunitaires suivaient un rythme circadien dans leur activité, par exemple la variation d'activité mitotique et de dégénérescence cellulaire dans le thymus de la souris suivant une période de 24h [195] [196]. Beaucoup d'autres exemples ont été publiés depuis, parmi lesquels certains concernent des fonctions immunitaires très spécifiques. Des études récentes ont par exemple montré que la différenciation des Th17 est contrôlée par l'horloge circadienne [197], que le gène circadien *Bmal1* régulaient les oscillations diurnes des monocytes inflammatoires Ly6C(hi) [198], ou que les protéines CRY1 et CRY2 régulaient l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires [183].



On peut aussi citer le cas de la mélatonine, cette hormone régulant les ajustements du rythme circadien est synthétisée de nuit par la glande pinéale sous contrôle des noyaux suprachiasmatiques. Les stimuli lumineux entraînent une diminution de son expression. Les niveaux sanguins de mélatonine sont normalement trop faibles pour être détectés pendant le jour mais sont beaucoup plus forts pendant la nuit, en l'absence de stimulation optique [181]. Hors, il est intéressant de noter que la mélatonine peut être reliée à certaines maladies auto-immunes. Par exemple, comparés à des sujets en bonne santé, la sécrétion de mélatonine nocturne est augmentée de façon significative chez les patients atteints d'Arthrite Rhumatoïde (AR) [199], de plus les niveaux de mélatonine de patients atteints d'AR sont plus élevés le matin [200]. Les cytokines inflammatoires, notamment l'interféron-gamma ( $IFN\gamma$ ), l'interleukine-1 et l'interleukine-6 sont toutes sécrétées chez l'homme par des cellules mononucléaires dans le sang en réponse à une stimulation de mélatonine.

Ces dernières années, des études ont permis de découvrir les effets des cytokines inflammatoires sur les mécanismes circadiens [201]. Par exemple, l'activation du système immunitaire réagit à une infection et augmente la résistance aux pathogènes en induisant un sommeil lent profond, sans doute via la production de cytokines inflammatoires telles que  $TNF-\alpha$ , IL-2, ou  $IFN-\gamma$  qui sont connues pour induire ce type de sommeil [202]. Dans le même temps, les cellules immunitaires montrent une augmentation de leur réponse pro-inflammatoire et une plus importante production d'IL-6 quand le rythme circadien est perturbé par un changement extérieur dans les cycles jour/nuit [203].

Dans les maladies inflammatoires et auto-immunes, les sources majeures de cytokines pro-inflammatoires sont les cellules T et les macrophages. La rate et les ganglions périphériques possèdent leurs propres rythmes circadiens, même ex-vivo, et les cellules de la rate sécrètent du  $TNF-\alpha$  et de l'IL-6 de façon circadienne [204]. Il est également intéressant de noter que la production de cytokines et de chemokines provoquée par des endotoxines lors d'infections

bactériennes est profondément affectée par l'expression des protéines BMAL1 et REV-ERB $\alpha$ . De plus, les récepteurs nucléaires ROR $\alpha$  et REV-ERB $\alpha$  régulent la transcription de BMAL1 dans les processus de boucle de régulation des gènes circadiens, et il a été démontré qu'un knock out de REV-ERB $\alpha$  provoque la perte de la part circadienne de la réponse immunitaire contre des endotoxines, particulièrement en ce qui concerne la production d'IL-6 par les macrophages [205]. Cette relation entre BMAL1 et l'inflammation a aussi été prouvée par le fait que des cellules myéloïdes ayant perdu BMAL1 montrent une perturbation de la différenciation et des oscillations circadiennes de leurs monocytes [206].

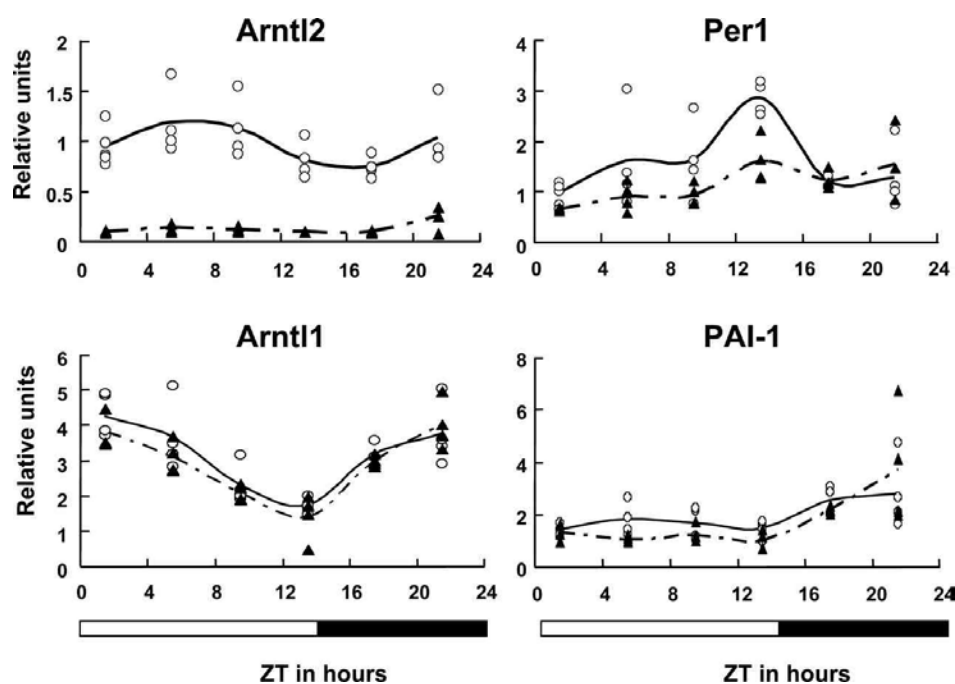
Les cellules T CD4<sup>+</sup> possèdent un oscillateur circadien qui contrôle les réponses rythmiques à des stimuli, comme on peut le constater en cas d'altération de la prolifération cellulaire et de la sécrétion de cytokines [198]. Il est intéressant de noter qu'il a déjà été démontré que le nombre des cellules T et leur réactivité était stable pendant la journée, tandis qu'une augmentation de ces paramètres était observée tard dans la soirée et tôt le matin ex-vivo [207].

Dans ce contexte, il n'est pas étonnant de trouver cette relation entre le gène *Arntl2*, participant activement à la régulation de ces rythmes circadiens [193], et une maladie auto-immune comme le diabète résultant d'un déséquilibre du système immunitaire. Cependant outre l'aspect des rythmes circadiens, ARNTL2 est avant tout un facteur de transcription.

### 3. *Arntl2* : un gène de résistance au diabète

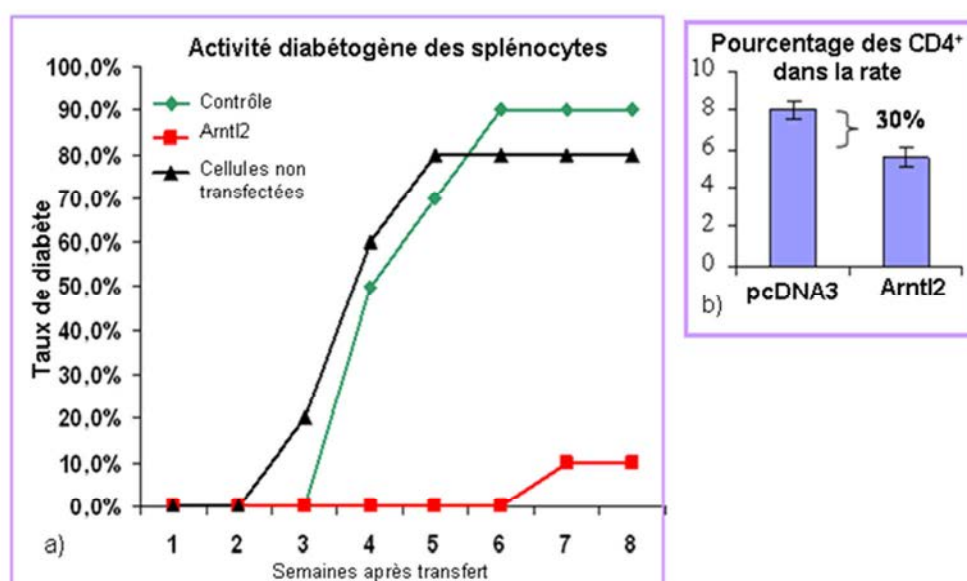
Au vu de ses éléments, *Arntl2* semble jouer un rôle dans la susceptibilité au DT1. Ses effets ont donc été analysés.

Dans un premier temps il a été démontré que l'expression de ce gène était bien différente en fonction des lignées et de l'allèle porté (**Figure 31**) et la très faible expression de ce gène dans la lignée NOD a été confirmée comparée à l'expression circadienne de la lignée 6.VIII possédant l'allèle C3H.



**Figure 31 :** Profil de transcription circadienne d'*Arntl2*, *Arntl1*, *Per1*, et *PAI-1* dans les rates de souris de 8 semaines 6.VIII (cercles blancs) et NOD (triangles noirs) dans une animalerie avec un rythme de 14 heures de jours (barre blanche) et 10 heures de nuit (barre noire). Résultats présentés en unité arbitraires. Valeurs p: *Arntl2*<0.012, *Arntl1*>0.362, *PAI-1*>0.111 et *Per1*=0.046 à ZT 1h30, 0.005 à 13h30 et>0.181 pour les autres horaires. ZT= zeitgeber time [158].

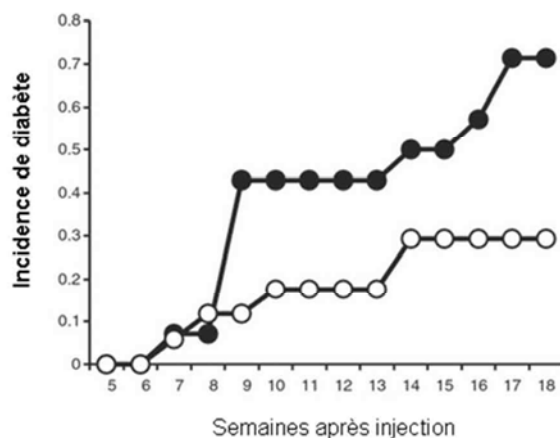
La suite de l'étude consistait donc à analyser le rôle exact de ce gène. Son action sur le diabète a été testée par transfection de plasmides entraînant sa surexpression dans des splénocytes diabétogènes de souris NOD, suivie de leur injection à des souris NOD/SCID (**Figure 32**). On a alors pu observer une très forte diminution de l'incidence de diabète, ainsi qu'une diminution de la quantité de cellules T CD4<sup>+</sup> dans la rate de ces souris [208].



**Figure 32 :** a. Etude de l'effet d'un transfert dans des souris NOD/SCID de cellules transfectées ou non avec un plasmide contrôle ou entraînant une surexpression d'ARNTL2 sur l'activité diabétogène des splénocytes d'une souris NOD. On observe que la surexpression d'ARNTL2 entraîne une très forte diminution du diabète (n=10) (valeur  $p < 0,001$ ) ; b. le pourcentage de cellules T CD4<sup>+</sup> dans la rate de ces souris a diminué de 30%.

ARNTL2 inhibe donc le transfert du diabète ainsi que la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> spléniques.

Parallèlement, afin de confirmer l'action d'*Arntl2*, l'effet d'une inhibition de son expression a été analysé à l'aide d'un plasmide exprimant un siRNA qui bloque spécifiquement son expression [209]. On constate qu'une inhibition d'*Arntl2* entraîne une augmentation de l'incidence de diabète d'environ 45% (**Figure 33**).



**Figure 33 :** L'injection du plasmide pSuper-siArntl2-2 dans les queues des souris congéniques NOD.C3H 6.VIII de 8 semaines (cercles noirs, n=17) augmente l'incidence de diabète par rapport à l'injection d'un plasmide contrôle pSuper-siControl (cercles blancs, n=14). P = 0.03

Au cours de ce test les proportions de différents types de cellules immunitaires ont été analysés 24h après les injections du plasmide pSuper-siArntl2-2. La proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> est augmentée suite à ces injections dans la rate (10.2%) et dans les ganglions pancréatiques (5.2%) comparé au contrôle, tandis que les proportions de cellules T CD8<sup>+</sup> et B ne varient pas. Dans le même temps il est intéressant de noter que les proportions des cellules T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> et FoxP3<sup>+</sup> diminuent suite aux injections du plasmide.

Ces études ont donc montré qu'une augmentation de l'expression d'*Arntl2* protège du diabète tandis que son inhibition augmente les risques, *Arntl2* joue donc un rôle protecteur contre le DT1. Cet effet semble passer par une diminution de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>, ainsi qu'une proportion plus élevées de cellules régulatrices parmi elles, ce qui semble tout à fait correspondre aux effets attribués à la région *Idd6* mais jusque-là le ou les gènes responsables n'avaient pas été identifiés.

## Projet : Comprendre le rôle d'*Arntl2* dans le diabète de type 1

Les résultats des études précédentes indiquent donc que le gène *Arntl2* codant pour un facteur de transcription lié au rythme circadien apporte une protection contre le diabète de type 1. En effet une surexpression de ce gène diminue l'incidence de diabète d'une lignée diabétique, et on observe une plus forte expression dans la lignée 6.VIIIc dont les splénocytes confèrent une résistance contre le diabète de type 1 comparé à ceux de la lignée 6.VIIIa.

Ce facteur de transcription intervient dans le rythme circadien, ce rythme biologique repose sur un mécanisme complexe de régulation par les gènes-horloges contrôlant entre autres des processus comme la prolifération cellulaire. Chez la souris, il a d'ores et déjà été démontré qu'*Arntl2* contrôle la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et l'équilibre entre les cellules T effectrices et régulatrices. Le déséquilibre entre les fonctions effectrices et régulatrices peut entraîner des maladies opposées comme l'auto-immunité et le cancer.

Notre hypothèse de départ était donc que le facteur de transcription ARNTL2 régule un ou plusieurs gènes responsables d'une protection ou d'une susceptibilité au diabète de type 1 et que les polymorphismes et la différence d'expression entre les lignées congéniques vont donc modifier cette régulation résultant en une différence de phénotype.

Notre objectif était donc d'identifier les gènes cibles régulés par *Arntl2*, et de comprendre comment ces variations de régulation peuvent affecter le développement du diabète.

# Résultats

## **I. Article 1 : Linking the circadian rhythm gene *Arntl2* to interleukin**

### **21 expression in type 1 diabetes**

Lebailly B, He C, Rogner UC (2014) Diabetes. 2014 Jun;63(6):2148-57.

Le gène aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator like 2 (*Arntl2*) a été identifié comme un gène candidat du locus lié au diabète *Idd6.3*. Des études précédentes tendent à attribuer un rôle dans l'expansion des cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> à ce gène, ce qui entraînerait un déséquilibre dans le ratio de cellules T effectrices et T régulatrices. Nos analyses de transcriptomes ont permis d'identifier les gènes régulés par ce facteur de transcription, et parmi eux se trouvait le gène de l'interleukine-21 (*Il-21*) comme une cible directe d'ARNTL2. ARNTL2 se lie de façon spécifique au site de liaison de l'ARN polymérase 2 du promoteur d'*Il-21* et inhibe son expression dans les souris congéniques NOD.C3H portant un allèle C3H sur le locus *Idd6.3* mais semble en être incapable dans les lignées de souris porteuses d'un allèle NOD d'*Idd6.3*. IL-21 est connue pour promouvoir l'expansion des cellules T et conformément à cela les souris avec un allèle C3H en *Idd6.3* produisent moins de cellules T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> comparées aux souris avec un allèle NOD en *Idd6.3*. Ces différences ont été trouvées pour les cellules immunitaires de la rate mais également du thymus. Ces cellules n'ont de plus pas le même effet diabéto-gène, les cellules T CD4<sup>+</sup> issus des lignées porteuses de la version NOD d'*Idd6.3* entraînant une incidence de diabète bien supérieure (80%) à celles issues des lignées porteuses de l'allèle C3H d'*Idd6.3* (20%) une fois injectées à des souris NOD.SCID.

Ces nouveaux résultats mettent en avant un rôle inattendu d'*Arntl2* dans la régulation du système immunitaire qui s'écarte de ses fonctions connues de régulation du rythme circadien.





Basile Lebailly,<sup>1,2</sup> Chenxia He,<sup>1</sup> and Ute C. Rogner<sup>1</sup>

# Linking the Circadian Rhythm Gene *Arntl2* to Interleukin 21 Expression in Type 1 Diabetes

*Diabetes* 2014;63:2148–2157 | DOI: 10.2337/db13-1702

The circadian rhythm–related aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*Arntl2*) gene has been identified as a candidate gene for the murine type 1 diabetes locus *Idd6.3*. Previous studies suggested a role in expansion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>−</sup> T cells, and this then creates an imbalance in the ratio between T-effector and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-regulator cells. Our transcriptome analyses identify the interleukin 21 (IL21) gene (*Il21*) as a direct target of ARNTL2. ARNTL2 binds in an allele-specific manner to the RNA polymerase binding site of the *Il21* promoter and inhibits its expression in NOD.C3H congenic mice carrying C3H alleles at *Idd6.3*. IL21 is known to promote T-cell expansion, and in agreement with these findings, mice with C3H alleles at *Idd6.3* produce lower numbers of CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells compared with mice with NOD alleles at *Idd6.3*. Our results describe a novel and rather unexpected role for *Arntl2* in the immune system that lies outside of its predicted function in circadian rhythm regulation.

The murine type 1 diabetes (T1D) locus *Idd6* is 1 of ~40 genetic loci identified in the NOD mouse (1). The *Idd6* candidate region (2), showing resistance to the spontaneous development of diabetes, overlaps with the candidate region for the resistance of immature T cells to dexamethasone (3–5) and for the control of low rates of proliferation in immature NOD thymocytes (6). *Idd6* controls the activity of regulatory CD4<sup>+</sup> T cells and invariant natural killer T cells (7,8).

Previous research has also focused on the identification of candidate genes and the underlying molecular networks (9–13). The analysis of three NOD.C3H subcongenic

strains (6.VIIIa, 6.VIIIb, and 6.VIIIc) derived from the original 6.VIII congenic strain showed the presence of at least three diabetes-related subloci contributing to the overall T1D resistance (*Idd6.1*, *Idd6.2*, *Idd6.3*), but *Idd6.3* alone controls the suppressive activity of splenocytes (10).

Transcription and sequence analysis revealed aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*Arntl2*) as candidate gene within *Idd6.3*. *Arntl2* encodes a basic helix-loop-helix/Per-Arnt-Sim transcription factor controlling the circadian rhythm. *Arntl2* is upregulated in the spleen and thymus of mice carrying C3H alleles at *Idd6.3* compared with mice carrying NOD alleles at the locus. In addition, several polymorphism and different splice forms were identified when comparing the gene and its transcripts in C3H and NOD strains (10). Diabetes incidence is increased by *Arntl2* mRNA interference in *Idd6* congenic mice concomitant with an increase in CD4<sup>+</sup> T cells and a decrease in regulatory CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells in the peripheral immune system (14). In addition, upregulation of cellular *Arntl2* levels correlates with inhibited CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation and their decreased diabetogenic activity (15).

The current study addresses transcriptional changes related to *Arntl2* expression in CD4<sup>+</sup> T cells. We show that *Arntl2* and *Idd6.3* control the expression of the interleukin 21 (IL21) gene (*Il21*) and the number of IL21-producing cells. The promoter of *Il21*, a gene that codes for an important cytokine involved in the proliferation of T cells, is directly targeted by ARNTL2 in an allele-specific manner. We propose that the circadian rhythm–related *Arntl2* gene has specific functions in regulating cytokines involved in T1D.

<sup>1</sup>Department of Developmental & Stem Cells Biology, Institut Pasteur, CNRS URA 2578, Laboratoire de Génétique Moléculaire Murine, Paris, France

<sup>2</sup>Université Pierre et Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, Paris, France

Corresponding author: Ute C. Rogner, ute-christine.rogner@pasteur.fr.

Received 6 November 2013 and accepted 3 February 2014.

This article contains Supplementary Data online at <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/suppl/doi:10.2337/db13-1702/-/DC1>.

© 2014 by the American Diabetes Association. See <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/> for details.

## RESEARCH DESIGN AND METHODS

### Mouse Strains

The NOD.C3H 6.VIIIa and 6.VIIIc congenic strains (10), NOD/Lt, and NOD/severe combined immunodeficiency (SCID) mice were maintained by brother-to-sister mating at the Pasteur Institut animal facility. NOD/SCID.C3H congenic mice were established from the congenic strains (7,10) by crossing them to the NOD/SCID strain. F1 generation mice were intercrossed, and mice homozygous for both the C3H-derived intervals and the SCID mutation were selected. All animal studies were approved by the relevant institutional review boards (Comité d'éthique en expérimentation animale CEEA 59, IDF, Paris) under the protocol number 2009-0015.

### Transcriptome Analyses

CD4<sup>+</sup> T cells were separated from splenocytes of three 7-week-old 6.VIIIa and 6.VIIIc female mice using the untouched isolation Kit II (Miltenyi Biotec SAS, Paris, France). One million cells were stimulated in a 24-well tissue culture plate with 25  $\mu$ L anti-CD3/CD28 activator beads (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 30 units (25  $\mu$ g/mL) of hIL2 (R&D Systems Europe, Lille, France). The cells were collected 24 h later, and the DNA-free RNAs were isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Splenocytes from two 8-week-old female NOD mice were used to separate the CD4<sup>+</sup> T cells (untouched Isolation Kit II, Miltenyi Biotec). Five million CD4<sup>+</sup> T cells were transfected with 10  $\mu$ g plasmid pcDNA3.1-ArntL2 (15) or control pcDNA3.1/HisC (Life Technologies) by nucleofection using Program X-001 (Amaza, Cologne, Germany). After culture for 3 h, the transfected cells were stimulated for 24 h and RNA was extracted.

The RNA quality was verified using a Bioanalyser 2100 (Agilent, Santa Clara, CA). Fluorochrome labeling and hybridization on Mouse Gene 1.0 ST Array were performed by the Pasteur Institute platform according to the manufacturers' instructions (Affymetrix, Santa Clara, CA). The microarray data were deposited in the ArrayExpress database under the accession number E-MTAB-1957.

### Diabetes Transfer Assays

CD25<sup>+</sup> splenocytes were prepared using the mouse CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotec), and  $5.5 \times 10^6$  cells in PBS were injected intravenously into recipient mice. Diabetes development was monitored twice weekly using the Diabur 5000 test (Roche, Mannheim, Germany). Animals were considered diabetic when their urine glucose level exceeded 250 mg/dL. Time-to-event distributions were calculated by Kaplan-Meier estimation and compared by log-rank tests during the period of observation.

### Quantitative RT-PCR

Five million CD4<sup>+</sup> T cells were purified using the untouched isolation kit (Miltenyi Biotec) from spleens of 6- to 8-week-old 6.VIIIa and 6.VIIIc female mice and used for total RNA isolation using the RNeasy Mini Kit (Qiagen).

For circadian analyses, spleen samples were collected and purified every 4 h during a 24-h period. Amounts of 200 ng to 10  $\mu$ g of the total RNA were used for quantitative (Q)-RT-PCR, as previously described (12). The amplification quantification in arbitrary units was performed by the  $\Delta$ Ct method using three replicates and *Arpo* as an endogenous control to normalize mRNA levels. The values are presented as mean  $\pm$  SD. Combined data of the experiments are presented as mean values  $\pm$  SE. The differences between two groups were analyzed using the Mann-Whitney method.

### Flow Cytometry Analysis

Expression of T-cell-specific proteins was analyzed by fluorescence-activated cell sorting after surface staining and/or intracellular staining using anti-mouse CD4 (Alexa Fluor 488 or Pacific Blue; BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), anti-mouse T-cell receptor (PerCP Cy5.5, BD Biosciences), anti-mouse B220 (PE Texas Red, BD Biosciences), anti-mouse CD8 (PECy7, BD Biosciences), anti-mouse IL17 (PE, BD Biosciences; or Alexa Fluor 488; eBiosciences, Paris, France), phycoerythrin-conjugated anti-mouse IL21 (PE, eBiosciences), anti-mouse interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (AF700, BD Biosciences), anti-mouse IL4 (APC, BD Biosciences), anti-mouse CD11c (APC, BD Biosciences), and anti-mouse FoxP3 (APC, eBiosciences) antibodies at optimal concentration. Briefly, the cells were stimulated for 4 h with phorbol myristate acetate (25 ng/mL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and ionomycin (10  $\mu$ g/mL; Sigma-Aldrich) in the presence of Brefeldin A (10  $\mu$ g/mL; BD Biosciences). The cells were washed with PBS 0.5% BSA, incubated in the eBioscience fixation/permeabilization buffers according to the manufacturer's protocol, and stained with fluorescent antibodies. Fluorescence-activated cell sorting was performed on a Cyan flowcytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) and analyzed using Flowjo software. Statistical analyses were performed using the Mann-Whitney method.

### Chromatin Immunoprecipitation Analyses

Splenocytes ( $3 \times 10^7$ ) or CD4<sup>+</sup> T cells ( $4 \times 10^6$ ) of female mice at 6–8 weeks of age were used for chromatin immunoprecipitation (ChIP) analyses using a previously described protocol (16) with the following modifications for chromatin digestion: 150 units MNase (Thermo Scientific, Villebon sur Yvette, France) were added for 10 min at 37°C, and the reaction was stopped with 4  $\mu$ L EDTA (500 mmol/L) and protease inhibitors. Extracts were sonicated to obtain DNA fragments between 160 and 320 bp. Magnetic beads for immunoprecipitation (Dynabeads Protein G; Life Technologies, St. Aubin, France) were prepared according to the manufacturer's indications and resuspended in TSE150 buffer (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl). Chromatin was precleared by incubation with 50  $\mu$ L magnetic beads for 1.5 h at 4°C on a rotating wheel. Precleared chromatin was then incubated with 4  $\mu$ g anti-ARNTL2 (SC-376287; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX), anti-ARNTL1 (ab3350;

Abcam, Paris, France), anti-RNA Pol II (PB-7c2; Euromedex, Strasbourg, France), anti-CLOCK (circadian locomotor output cycles kaput) (ab3517; Abcam), anti-histone H3 (ab6002; Abcam), or anti-histone H3 acetyl (ab12179; Abcam) antibodies overnight at 4°C on the rotating wheel. Negative control precipitations used 10  $\mu$ L total rabbit serum. Incubation was continued with 50  $\mu$ L magnetic beads for 2 h at 4°C on the rotating wheel. Beads were then washed and eluted as described previously (16).

All quantifications were performed by real-time PCR in the presence of SYBR Green (Roche, Boulogne-Billancourt, France) on three replicates using 50 ng DNA. The results were calculated and normalized as (Ct of IP/Ct of input)/(Ct of control-IP/Ct of input). Data for single experiments are presented as means  $\pm$  SE of experiments and as means  $\pm$  SD of three technical replicates. We have verified that the anti-ARNTL2 antibodies were equally efficient for both the NOD and the C3H allelic version of ARNTL2 in IP experiments, followed by Western blotting using an anti-ARNTL2 antibody (ab86530; Abcam). For screening of *Il21* by ChIP we designed primers from 2,500 bp 5' of the start codon to 2,000 bp 3' of the stop codon. For *Arntl2*, we designed primers every 250 bp from 600 bp 5' of the start codon to 4,500 bp 3' of it (Supplementary Table 1).

## RESULTS

### Identification of Genes Regulated by *Idd6.3* and *Arntl2* in CD4<sup>+</sup> T Cells

We performed two complementary transcriptome analyses on CD4<sup>+</sup> T lymphocytes to identify genes with a variation of expression linked to *Arntl2*. In the first experiment, we compared the transcriptomes of CD4<sup>+</sup> T cells isolated from spleens of the NOD.C3H 6.VIIIa and 6.VIIIc strains containing, respectively, NOD and C3H alleles at the *Idd6.3* locus, which spans *Arntl2*. In the second experiment, we compared the transcriptomes of NOD CD4<sup>+</sup> T cells transfected with pcDNA3.1/HisC plasmids that allowed overexpression of *Arntl2* or not (15). Both experiments were done in triplicate, and genes with  $P \leq 0.05$  in the Bonferroni test were considered for further analysis. We identified 44 genes differentially expressed in CD4<sup>+</sup> T cells of the two congenic strains and 223 genes in the overexpression test. Although about half of the genes in the first experiment were up- or downregulated in strain 6.VIIIc compared with strain 6.VIIIa, the *Arntl2* overexpression resulted in upregulation of more than 80% of the genes. Using medium stringency in the DAVID (Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery) functional annotation, we identified 36 clusters among the 223 genes that were mostly associated with general cellular function, in particular, with ribosome complexes. This may reflect the increased protein production after overexpression. The 44 differential genes identified in the two strains clustered into only four clusters, including ribosomal proteins (enrichment score, 2.12), cytokine activity (score, 1.37), membrane proteins (score, 0.02), and

ion binding (score, 0.01). Within the cytokine cluster we identified, for example, IFN- $\gamma$ , IL3, IL21, IL22, and the high-mobility group box protein 1.

The two experiments had 24 genes in common (Table 1). We next asked if genes identified in the microarray experiments follow the same circadian rhythm as *Arntl2*. We analyzed the expression in the 6.VIIIa and 6.VIIIc strains, and to this end, we isolated the spleens of 5- to 7-week-old female mice at different times of the day, selected the CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, and extracted their RNA to test gene expression by Q-RT-PCR. The level of *Arntl2* expression in the 6.VIIIa strain was relatively low, but interestingly, 9 of the 24 genes—*Ccl19*, *Cox7c*, *Hmgb1*, *Il21*, *Rpl26*, *Rpl35a*, *Rps8*, *Serpib9*, and *Tmed2*—found in the transcriptome analysis had a pattern very close to *Arntl2* in the 6.VIIIa strain (Fig. 1). *Gag* and *H2t22* showed this expression variation in strain 6.VIIIa, but an alteration in strain 6.VIIIc, which did not correspond to the expression variation of *Arntl2*. *AW112010*, *Car2*, *Eraf*, *Il22*, *Rnu2*, *Rpl17*, and *Rpl29* had a very different expression variation. For most of the genes, we found expression differences at limited time points (Fig. 1 and Table 1). Interestingly, only *Il21* showed differences between 6.VIIIa and 6.VIIIc mice during all the time points from 9:00 A.M. to 5:00 P.M. (1700 h). IL21 has an important role in the expansion of the T cells and on the immune response that may correlate with previous observation of the function of *Arntl2* in T-cell proliferation. We therefore decided to analyze further the expression of this IL in our congenic mice.

### IL21-Producing CD4<sup>+</sup> T Cells Are Increased by NOD Alleles at *Idd6.3*

The transcriptome and the Q-RT-PCR results show a higher level of *Il21* transcripts in the CD4<sup>+</sup> T cells of the 6.VIIIa strain compared with the 6.VIIIc strain. This difference could be due to an increased number of cells expressing IL21. We addressed this question by flow cytometric analysis using anti-IL21 staining on T-cell receptor and CD4-labeled splenocytes (Fig. 2A). In agreement with the transcriptional results, the 6.VIIIc strain with C3H alleles at the *Idd6.3* locus and expressing higher levels of *Arntl2* exhibits less CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells than the 6.VIIIa strain with NOD alleles at *Idd6.3* and expressing lower levels of *Arntl2*. The test showed also that the CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T-cell difference between the two strains decreased with age and that 10- to 13-week-old 6.VIIIc mice exhibit CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T-cell numbers similar to 6.VIIIa mice (Fig. 2B). The age-dependent effect was also found in pancreatic lymph nodes. Significant differences were observed at 3 weeks of age (6.VIIIa, 4.24%; 6.VIIIc, 2.51% [ $n = 4$ ];  $P = 0.029$ ) but not in older mice.

IL21 is produced by several CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations, but mostly by Th17<sup>+</sup> cells. We analyzed different CD4<sup>+</sup> T-cell subpopulations in our strains to test if *Idd6.3* influences their number. We used antibodies against IL17, a specific IL of Th17 cells, antibodies against IL4, specific for Th2 cells, and antibodies against IFN- $\gamma$ , specific for

**Table 1—Summary of the microarray data showing the genes in common between the two experiments using activated CD4<sup>+</sup> T cells**

Accession number	Fold change		Gene name	Confirmed by Q-RT-PCR
	Congenicity	Overexpression		
NM_172309	1.7	14.7	<i>Arntl2</i>	1, 5, 9, 13, 17, 21 h
BC057932	−1.8	−1.6	Gag protein	5 h
BC064790	3.5	2.2	<b>High mobility group box 1 (<i>Hmgb1</i>)</b>	17 h
BC086792	−2.1	−3.9	<b>Cytochrome c oxidase, subunit VIIc (<i>Cox7c</i>)</b>	5 h
BC091759	−1.4	−1.8	Ribosomal protein L17 ( <i>Rpl17</i> )	5 h
EF660528	−1.4	−1.7	Interferon-induced mRNA AW112010	No difference
ENSMUST00000080300	−1.5	−2.4	Ribosomal protein S25 ( <i>Rps25</i> )	Not tested
L08651	−1.5	−2.6	Ribosomal protein L29 ( <i>Rpl29</i> )	No difference
M13967	1.4	1.4	Heat shock protein 8 ( <i>Hspa8</i> )	Not tested
NM_001105179	1.9	1.6	Vomeroneasal 2, receptor 42 ( <i>Vmn2r42</i> )	Not tested
NM_008147	−1.6	−1.7	Glycoprotein 49 A ( <i>Gp49a</i> )	Not confirmed
NM_009080	−1.4	−1.6	Ribosomal protein L26 ( <i>Rpl26</i> )	No difference
NM_009098	−1.8	−3.2	<b>Ribosomal protein S8 (<i>Rps8</i>)</b>	13 h
NM_009220	2.0	1.7	Spermiogenesis specific transcript on the Y 1 ( <i>Ssty1</i> )	Not tested
NM_009256	−1.4	−1.6	<b>Serine (or cysteine) peptidase inhibitor (<i>Serpinb9</i>)</b>	No difference
NM_009801	−1.6	−1.5	Carbonic anhydrase 2 ( <i>Car2</i> )	1 h
NM_010397	−2.5	−1.6	Histocompatibility 2, T region locus 22 ( <i>H2-T22</i> )	13, 17 h
NM_011888	1.4	2.0	<b>Chemokine (C-C motif) ligand 19 (<i>Ccl19</i>)</b>	1, 9 h
NM_016971	−4.3	−1.7	Interleukin 22 ( <i>Il22</i> )	No difference
NM_019770	−1.5	−1.9	<b>Mus musculus transmembrane emp24 domain trafficking protein 2 (<i>Tmed2</i>)</b>	13 h
NM_021338	−1.4	−2.6	<b>Ribosomal protein L35a (<i>Rpl35a</i>)</b>	No difference
NM_021782	−2.0	−1.6	<b>Interleukin 21 (<i>Il21</i>)</b>	9, 13, 17, 21 h
NM_133245.1	−1.4	−2.1	Mus musculus erythroid associated factor ( <i>Eraf</i> )	No difference
NM_197889	1.6	2.2	Interferon $\zeta$ ( <i>IFNz</i> )	Not tested
NR_004414	−1.5	−1.8	U2 small nuclear RNA ( <i>Rnu2</i> )	No difference

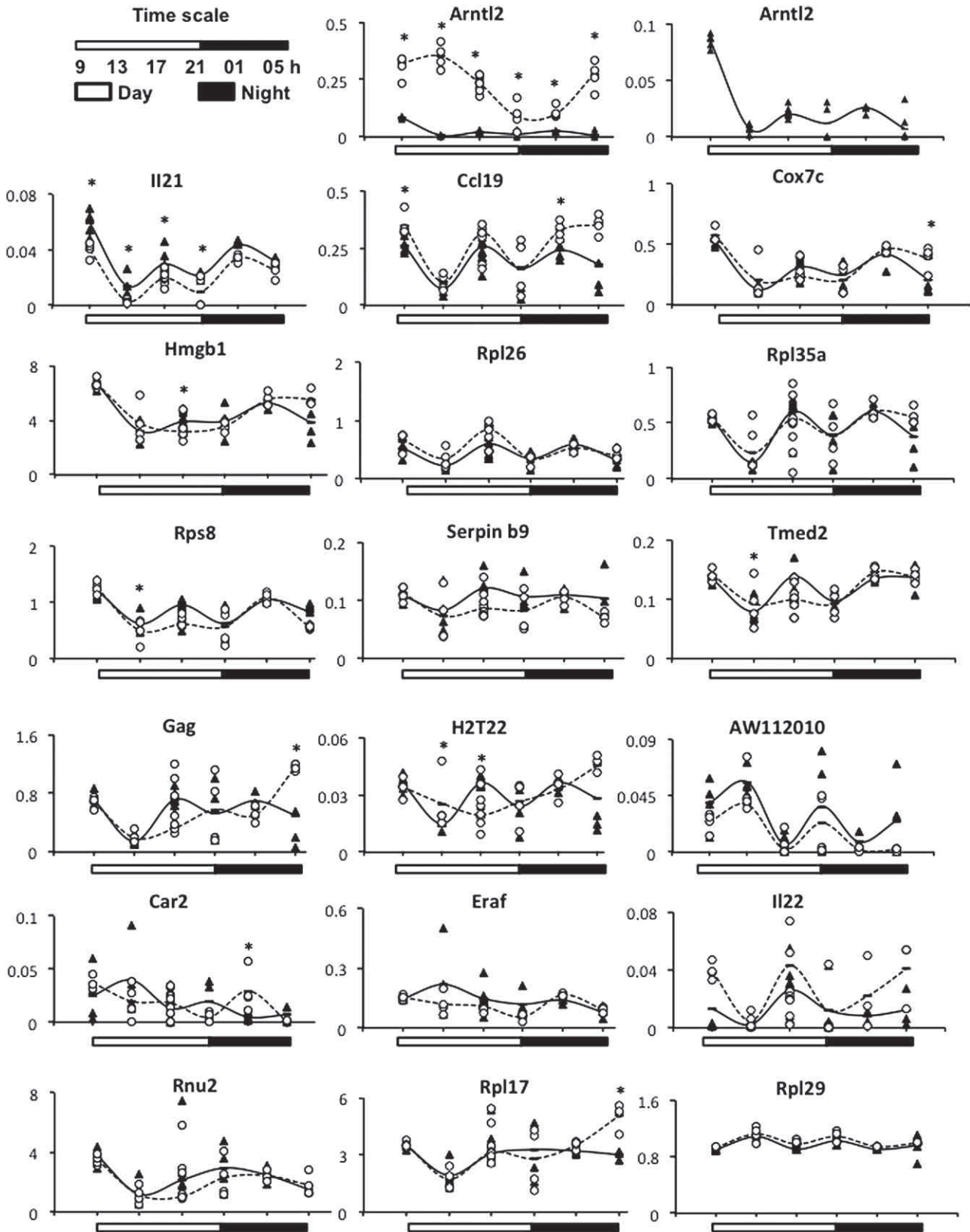
Fold changes are shown as NOD.C3H 6.VIIIc vs. 6.VIIIa and overexpression of *Arntl2* vs. control. Genes showing similar circadian rhythm as *Arntl2* in strain 6.VIIIa are marked in bold. Genes not confirmed by Q-RT-PCR on the original samples are marked as not confirmed, and absence of suitable primers is marked as not tested.

Th1 cells. Th1, Th2, and Th17 are effector cells involved in regulating the immune balance together with Treg cells. We also tested the proportion of CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T cells. FoxP3 is a specific factor of regulatory T cells (Fig. 3A). We found an effect of the locus *Idd6.3* on the proportion of the Th17 and Th2 cells but not on the Th1 and the Treg cells. There is a strong variation between the strains 6.VIIIa and 6.VIIIc for IL17, indicating that the 6.VIIIa strain splenocytes contain more Th17 CD4<sup>+</sup> T lymphocytes than those of the 6.VIIIc strain. A smaller but significantly different effect was found for IL4-producing CD4<sup>+</sup> T cells. This result indicates that the difference in CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells correlates with the Th17 and Th2 cells producing this cytokine. We also tested the proportions

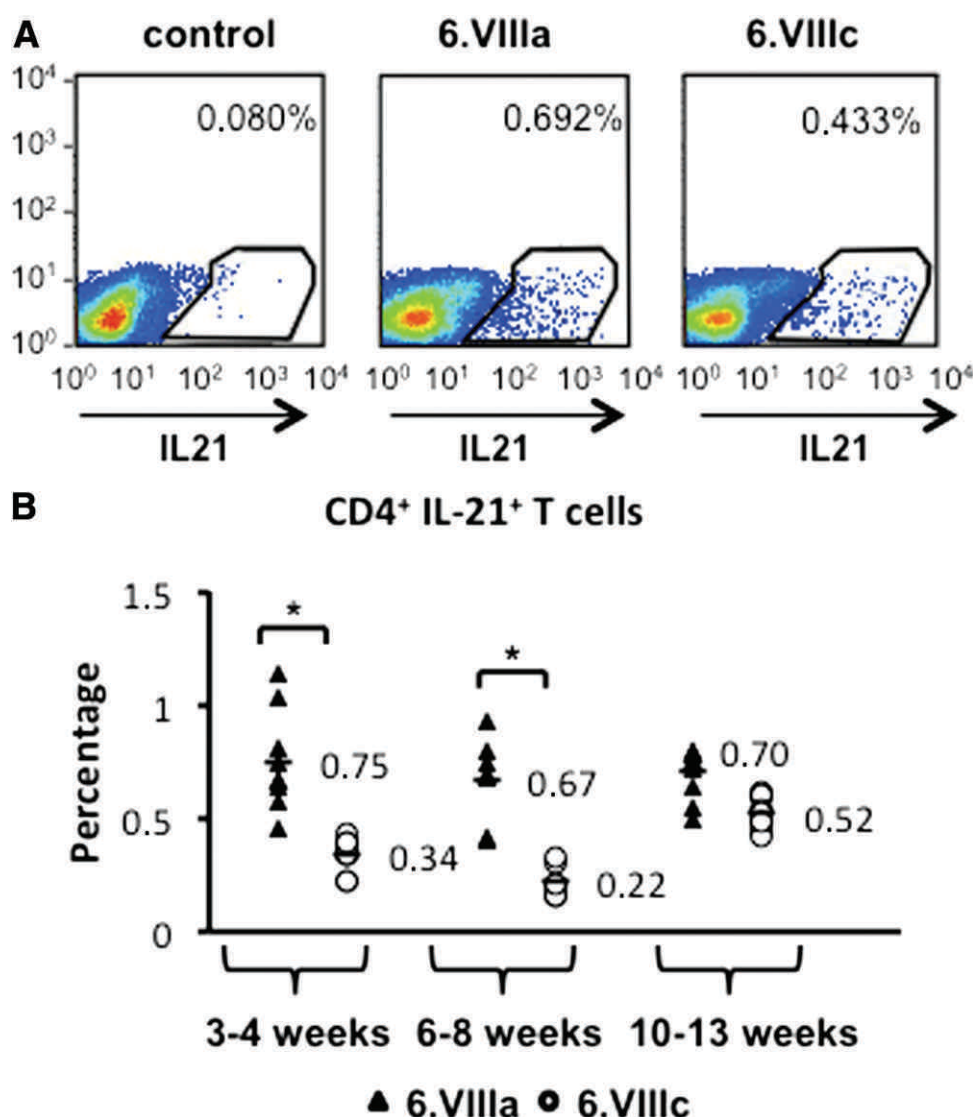
of CD4<sup>+</sup>IL22<sup>+</sup> T cells, a cytokine previously identified in the transcriptome analyses but not further confirmed by Q-PCR. IL22 is also produced by Th17 cells. There was no significant difference for CD4<sup>+</sup>IL22<sup>+</sup> T cells at 3 weeks (6.VIIIa, 0.49%; 6.VIIIc, 0.38% [*n* = 9]; *P* > 0.298), 6 weeks (6.VIIIa, 0.42%; 6.VIIIc, 0.40% [*n* = 9]; *P* > 0.124), or 12 weeks (6.VIIIa, 1.06%; 6.VIIIc, 0.88% [*n* = 9]; *P* > 0.169).

We also tested whether the congenic mice exhibit differences in major immune cell populations (Fig. 3A). We found significant differences for CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells that were increased in 6.VIIIa splenocytes. B cells and CD11c<sup>+</sup> cells were increased in 6.VIIIc splenocytes. The relative expansion of T cells in 6.VIIIa





**Figure 1**—Circadian expression of genes in splenic CD4<sup>+</sup> T cells from 6- to 8-week-old female mice of strain 6.VIIIa (▲) and 6.VIIIc (○) ( $n = 4$  for all time points except for 1700 h, which is  $n = 8$ ). Values on the y-axis represent arbitrary units. \* $P < 0.05$ .



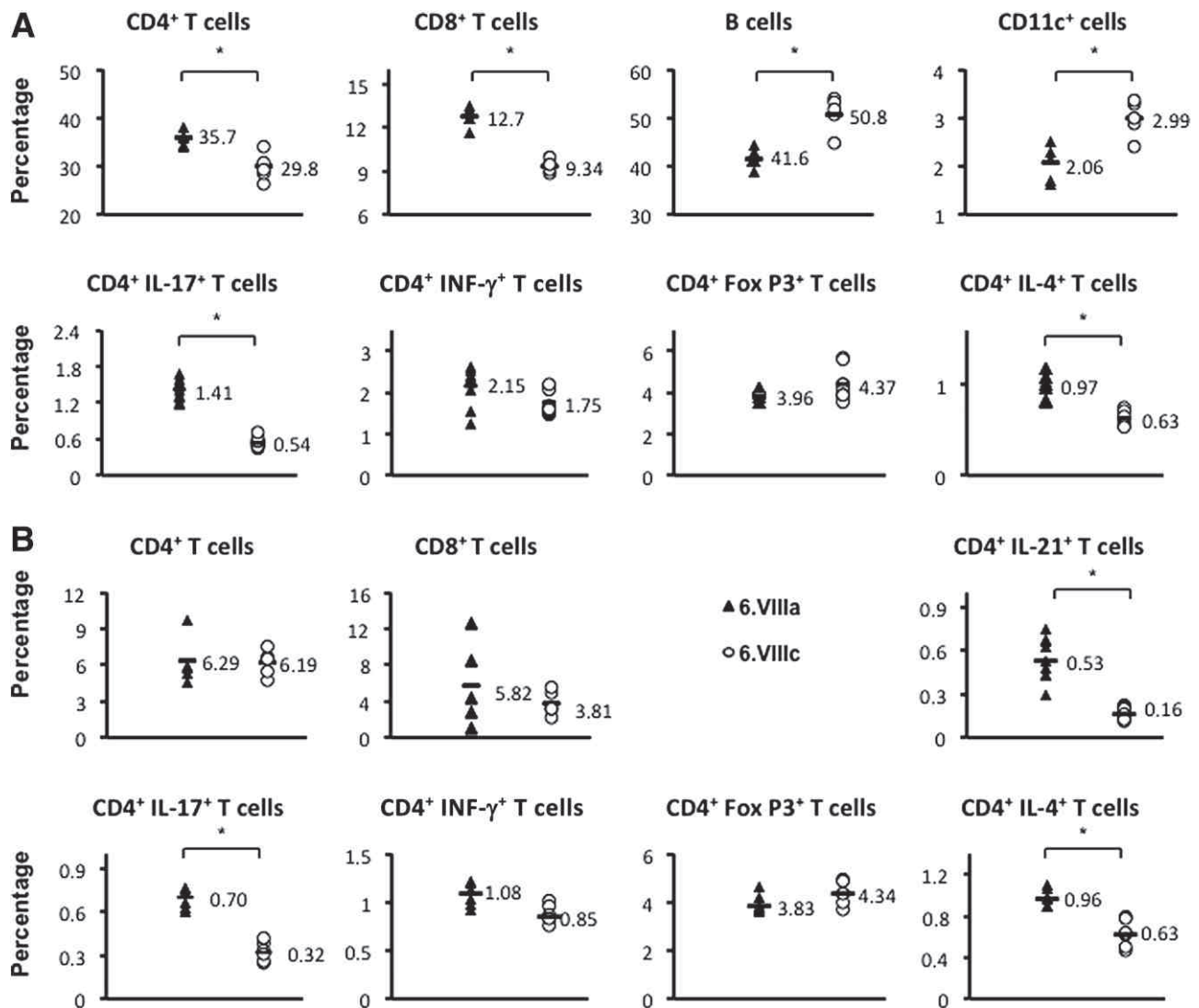
**Figure 2**—A: Example of a cytometric analysis of stimulated splenic CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells of the mouse strains 6.VIIa and 6.VIIc at 6 weeks of age compared with a nonstimulated negative control. B: Analysis by flow cytometry of the proportion of the stimulated CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells in the spleens of the 6.VIIa and 6.VIIc strains. All the mice were females ( $n = 8$ ). \* $P = 0.009$  between the strains at 3–4 weeks and  $P = 0.001$  at 6–8 weeks, but not significant ( $P = 0.342$ ) at 10–13 weeks.

splenocytes may be the direct result of increased IL21 levels (17). This result correlates with the previous findings of inhibition of CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation by *Arntl2* (14,15). Interestingly, the differences in T-cell numbers were not yet significant at 3 weeks of age for CD4<sup>+</sup> T cells (6.VIIa, 37.24%; 6.VIIc, 29.37% [ $n = 4$ ];  $P > 0.112$ ) or CD8<sup>+</sup> T cells (6.VIIa, 14.10%; 6.VIIc, 19.14% [ $n = 4$ ];  $P = 0.665$ ), although differences in the IL21-producing CD4<sup>+</sup> T cells were already present. This would suggest that the differences in IL21-producing cells precede the expansion of T cells. At 12 weeks of age, the significant T-cell differences were no longer present for CD4<sup>+</sup> T cells (6.VIIa, 27.09%; 6.VIIc, 23.87% [ $n = 4$ ];  $P = 0.061$ ) or CD8<sup>+</sup> T cells (6.VIIa, 17.60%; 6.VIIc, 16.77% [ $n = 4$ ];  $P = 0.47$ ).

Because T-cell development and selection takes place in the thymus, we performed flow cytometric analyses using thymic cells of the strains 6.VIIa and 6.VIIc (Fig. 3B). The number of CD4<sup>+</sup> T cells and CD8<sup>+</sup> T cells were similar, and no difference was found for double-positive or double-negative T cells. Only among the CD4<sup>+</sup> T cells did we detect differences in IL21<sup>+</sup>, IL17<sup>+</sup>, and IL4<sup>+</sup> cells. This result indicates that the observed differences between the 6.VIIa and 6.VIIc strains may be established during the negative selection of CD4<sup>+</sup> T cells in the thymus.

#### NOD Alleles at *Idd6.3* Increase the Diabetogenic Activity of Splenocytes

Our previous studies showed that the *Idd6.3* interval, containing the gene *Arntl2*, influences protection in diabetes cotransfer assays. Splenocytes from the congenic strain

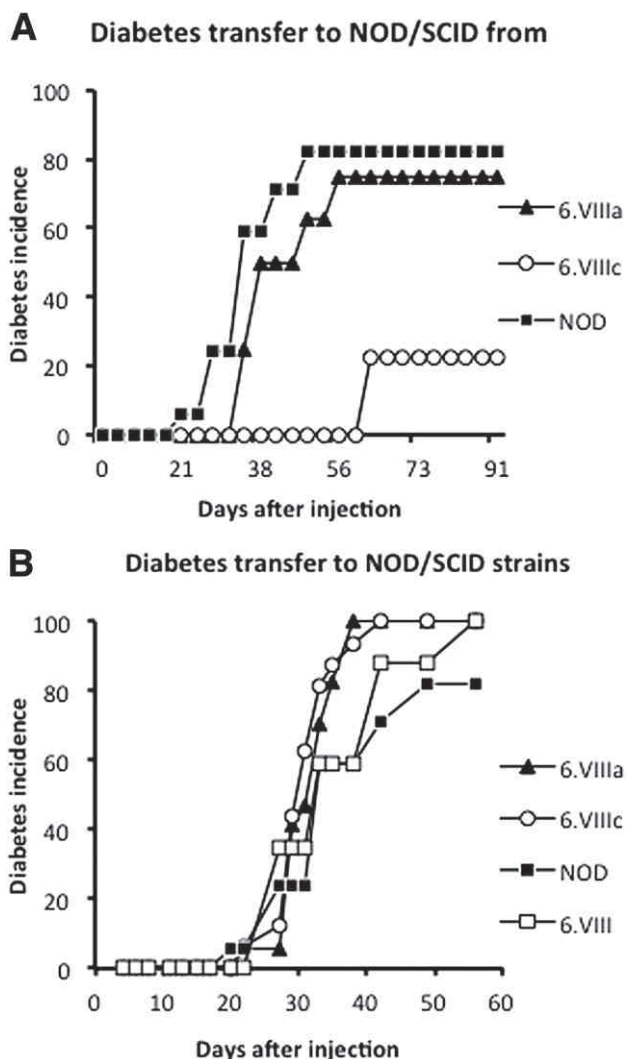


**Figure 3—A:** Analysis by flow cytometry of the proportions of the different immune cells in the spleen of the congenic strains 6.VIIIa and 6.VIIIc. *Upper panel:* Proportions of splenic CD4<sup>+</sup> T cells, CD8<sup>+</sup> T cells, B cells, and CD11c<sup>+</sup> cells. *Lower panel:* Proportions of IL17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>, and IL4<sup>+</sup> cells among the CD4<sup>+</sup> T cells. Female mice were 4 to 6 weeks old ( $n = 9$ ). \* $P < 0.01$ . **B:** Analysis by flow cytometry of the proportions of the different types of T cells in the thymus of the strains 6.VIIIa and 6.VIIIc. *Upper panel:* Proportions of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells. *Lower panel:* Proportions of IL17<sup>+</sup>, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>, and IL4<sup>+</sup> cells among CD4<sup>+</sup> T cells. Female mice were 4 to 6 weeks old ( $n = 9$ ). \* $P < 0.01$ .

NOD.C3H 6.VIIIc (carrying C3H alleles at *Idd6.3*) confer more protection than those of the congenic strain NOD.C3H 6.VIIIa (carrying NOD alleles at *Idd6.3*) (10). Our results on increased IL21 production in 6.VIIIa splenic CD4<sup>+</sup> T cells and the changes in the balance between T cells and B cells and macrophages indicate that splenocytes from 6.VIIIa mice are likely to be more diabetogenic than those from 6.VIIIc mice. To validate this assumption, we injected CD25<sup>+</sup> splenocytes obtained from 10-week-old female NOD.C3H 6.VIIIa, NOD.C3H 6.VIIIc, and NOD mice to NOD/SCID mice. Cells from NOD.C3H 6.VIIIc induced significantly less diabetes than cells from NOD.C3H 6.VIIIa and NOD mice (Fig. 4A). These results confirm that C3H alleles at *Idd6.3* decrease the diabetogenic activity of splenocytes.

To study if *Idd6.3* alleles contribute to diabetes resistance factors outside of the immune system, we transferred diabetogenic CD25<sup>+</sup> splenocytes isolated from diabetic NOD mice to NOD/SCID.6.VIIIa and NOD/SCID.6.VIIIc mice. These strains did not significantly differ in their diabetes incidence from each other, neither from NOD/SCID nor the previously described *Idd6* congenic strain NOD/SCID.C3H 6.VIII (Fig. 4B). We concluded that the *Idd6.3* alleles, like the *Idd6* alleles (7), do not provide major resistance factors in the absence of an intact immune system. We also tested the proportions of CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells 1 and 3 days after transfer to NOD/SCID.C3H 6.VIIIa and NOD/SCID.C3H 6.VIIIc mice. We found no difference between strains or time points (day 1: 6.VIIIa, 1.22%; 6.VIIIc, 1.39%; day 3: 6.VIIIa, 1.37%, 6.VIIIc, 1.21% [ $n = 4$ ];





**Figure 4—A:** Diabetes incidence of NOD/SCID mice after transfer of CD25<sup>+</sup> splenocytes from the strains 6.VIIIa ( $n = 12$ ) ( $P = 0.82$ ) and 6.VIIIc ( $n = 11$ ) ( $P = 0.026$ ) compared with NOD CD25<sup>+</sup> ( $n = 17$ ) splenocytes. **B:** Diabetes incidence of the strains NOD/SCID.C3H 6.VIIIa ( $n = 12$ ), NOD/SCID.C3H 6.VIIIc ( $n = 15$ ), NOD/SCID.C3H 6.VIII ( $n = 17$ ), and NOD/SCID ( $n = 14$ ) after transfer of diabetogenic CD25<sup>+</sup> NOD splenocytes. There are no significant differences.

$P = 0.357$  to  $P = 0.440$  for all comparisons). Together, these tests indicate that an intact immune system may be required to establish the strain-dependent differences in this cell population.

### *Il21* Is a Target Gene of ARNTL2

The rapid induction of *Il21* but not of the *Il17* expression within 24 h after transfection with ARNTL2-expressing plasmids suggests that ARNTL2 acts on the transcriptional level of *Il21*. To test if *Il21* could be a direct target of ARNTL2, we used ChIP to analyze the presence of the ARNTL2 protein on the *Il21* gene. To this end, we designed and tested a set of primer pairs throughout the gene for use in ChIP-Q-PCR (Fig. 5D). Our results show that ARNTL2 binds with a strong peak of ~1,000 bp upstream

of the start codon of *Il21* (Fig. 5A). The binding is found in the 6.VIIIc strain but absent in the 6.VIIIa strain. The use of anti-histone H3 and anti-acetylated histone H3 antibodies resulted in no differences in the *Il21* region, suggesting that the binding pattern for ARNTL2 is not due to general differences in the chromatin accessibility in the strains (Supplementary Fig. 2B and C). Our results suggest that ARNTL2 may act as a transcriptional repressor in strain 6.VIIIc. This hypothesis is reinforced by our finding that RNA polymerase II binds to the same position as ARNTL2 not only in 6.VIIIa but also in strain 6.VIIIc (Fig. 5B).

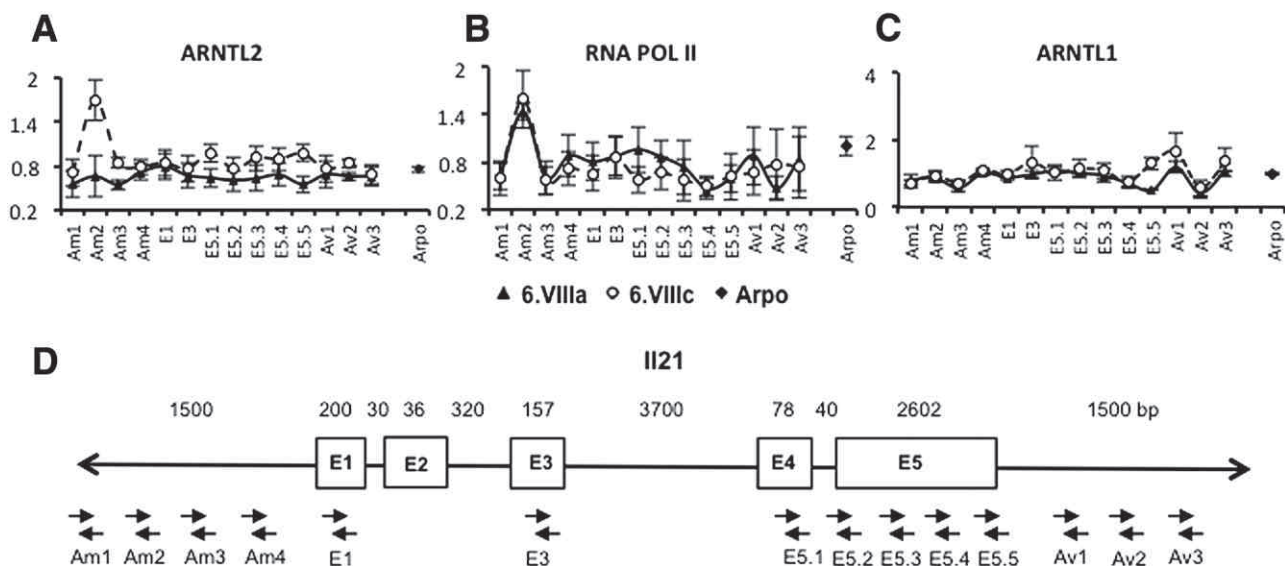
Interestingly, we could not detect any specific binding or differential binding of CLOCK or ARNTL1 on *Il21* (Supplementary Fig. 2A and Fig. 5C), strongly suggesting that these factors have no direct influence on the expression of *Il21*.

### DISCUSSION

The results presented here suggest that the *Idd6.3* locus, containing the circadian rhythm-related *Arntl2* gene, controls the development of IL21-producing CD4<sup>+</sup> T cells in the thymus of the NOD mouse. This is underlined by the finding that mice carrying NOD alleles at *Idd6.3* show a higher number of CD4<sup>+</sup>IL21<sup>+</sup> T cells in the thymus and the spleen than mice carrying C3H alleles at *Idd6.3*. Mice carrying NOD alleles at *Idd6.3* show increased number of splenic CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells and reduced numbers of B cells and macrophages. This observation may be directly linked to the increased number of IL21-producing cells and their effect on the expansion of T cells (18). The differences in IL21 expression can also, at least partly, explain the differences in diabetogenic activity between 6.VIIIa- and 6.VIIIc-derived splenocytes. The effects on IL21 production and T-cell expansion occur in younger mice and disappear with age, and interestingly, diabetes incidence of 6.VIIIa and 6.VIIIc mice was found to be similar (10).

Our transcriptome studies suggest that ARNTL2 controls the expression of the *Il21* gene and that high levels of ARNTL2 suppress *Il21* expression. Knowing the role of IL21 in the immune system, the expansion of T cells, and in particular as being a major factor in T1D (19–22), our previous results become explainable (14,15). The decrease in diabetogenic activity of *Arntl2*-overexpressing splenocytes could be related to decreased IL21 production. Because *Arntl2* is ubiquitous and IL21 is a pleiotropic cytokine, effects on other cell types in our mouse model must be expected and remain to be studied, and ARNTL2 may target other genes that have not yet been revealed by our analysis.

Targeting of the promoter of *Il21* by ARNTL2 at the RNA polymerase binding site appears to be allele-specific, and the targeted DNA sequence contains potential E-box sequences. Although we detected binding of proteins expressed from *Arntl2* C3H alleles, no binding was found for NOD alleles. Our ChIP experiments indicate that



**Figure 5**—Analysis by ChIP-Q-PCR of the binding of ARNTL2 on *Il21* in splenic CD4<sup>+</sup> T cells of the strains 6.VIIla and 6.VIIlc. ChIP using an anti-ARNTL2 antibody (A), an anti-RNA polymerase (Pol) II antibody (B), and an anti-ARNTL1 antibody (C). Results are compared with those for the transcription start site of *Arpo*. ARNTL2 binds on *Il21* in strain 6.VIIlc but not in strain 6.VIIla (position Am2). Figure shows three experiments  $\pm$  SE. D: Representation of the structure of the *Il21* gene and primer localization.

ARNTL2 acts as a transcriptional repressor of *Il21*, but whether ARNTL2 itself, its protein partners, or other mechanisms are involved is not clear at this point. Our controls did not indicate that the antibodies for ChIP experiments discriminate between the allelic versions; however, we cannot exclude the existence of a NOD-specific isoform that is undetectable by our antibodies.

It is interesting to note that the circadian profile of *Il21* resembles that of the NOD allelic version of *Arntl2* in 6.VIIla mice but not the C3H allelic version of *Arntl2* in 6.VIIlc mice. *Il21* was constantly downregulated during daytime in 6.VIIlc mice compared with 6.VIIla mice. One interpretation of this observation would be that both genes are under a common control in NOD mice, either of the peripheral or central circadian regulatory system. Interestingly, CLOCK and ARNTL1 were not found to bind to the promoter of *Il21*, and this makes a direct regulation through these factors in CD4<sup>+</sup> T cells rather unlikely.

We analyzed the expression of other circadian genes in splenic CD4<sup>+</sup> T cells of both congenic strains. Several of them exhibited expression differences. At 1700 h (5:00 P.M.) period 1 (*Per1*) was found upregulated in 6.VIIla and period 2 (*Per2*) in 6.VIIlc. *Clock* was found upregulated in 6.VIIla at 1300 h (1:00 P.M.) and in 6.VIIlc at 1700 h (5:00 P.M.). No changes in the circadian rhythm were observed for *Arntl1*, *Arnt*, *Per1*, and *Per2*, suggesting that there is no general difference in the expression of circadian rhythm-associated genes (Supplementary Fig. 1). However, for the *Clock* gene we found a shift of the peak of expression in strain 6.VIIlc compared with strain 6.VIIla. This may, in turn, again influence the circadian expression of *Arntl2* because CLOCK binds to the

promoter of the *Arntl2* gene (Supplementary Fig. 3). It is interesting to note that *Arntl1*, *Per1*, and *Per2* have a similar profile in expression in both strains as *Arntl2* in strain 6.VIIla. Changes in the circadian rhythm of *Arntl2* may be due to its sequence alteration in 6.VIIlc mice. ARNTL1 and ARNTL2 bind to the *Arntl2* gene but with a different profile between the two strains. This may not be surprising because a number of polymorphisms between the NOD and C3H sequences are detectable in the *Arntl2* gene (13). These observations point to an interest of further detailed studies on the circadian circuit in immune cells in the future.

In summary, our results suggest a novel role for ARNTL2 in the control of the immune system and in the development of T1D, which is not necessarily related to its proposed action in the circadian regulation. These findings reinforce the evidence that components of the immune system undergo circadian rhythm control (23).

**Acknowledgments.** The authors thank Philip Avner (EMBL, Italy) and Christian Boitard (Institut Cochin, France) for continuous support during this project; Agnès Lehen and Yannick Simoni (both at Institut Cochin, France) for helpful discussions; Guillaume Soubigou (Institut Pasteur, France) for microarray processing; and Chantal Becourt (Institut Cochin, France) and Corinne Veron and Pierre Alcan (Institut Pasteur, France) for technical assistance.

**Funding.** This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche, the Association pour la Recherche sur le Diabète, and the European Foundation for the Study of Diabetes/JDRF/Novo Nordisk Programme, Cardiovasculaire-Obésité-Rein-Diabète, and by recurrent funding from the Centre National de la Recherche Scientifique, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and Institut Pasteur.

**Duality of Interest.** No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

**Author Contributions.** B.L. and U.C.R. researched data and wrote the manuscript. C.H. researched data and reviewed the manuscript. U.C.R. is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.

## References

1. Smink LJ, Helton EM, Healy BC, et al. T1DBase, a community web-based resource for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res* 2005;33(Database issue):D544–D549
2. Rogner UC, Boitard C, Morin J, Melanitou E, Avner P. Three loci on mouse chromosome 6 influence onset and final incidence of type I diabetes in NOD.C3H congenic strains. *Genomics* 2001;74:163–171
3. Leijon K, Hammarström B, Holmberg D. Non-obese diabetic (NOD) mice display enhanced immune responses and prolonged survival of lymphoid cells. *Int Immunol* 1994;6:339–345
4. Penha-Gonçalves C, Leijon K, Persson L, Holmberg D. Type 1 diabetes and the control of dexamethazone-induced apoptosis in mice maps to the same region on chromosome 6. *Genomics* 1995;28:398–404
5. Bergman ML, Duarte N, Campino S, et al. Diabetes protection and restoration of thymocyte apoptosis in NOD Idd6 congenic strains. *Diabetes* 2003;52:1677–1682
6. Bergman ML, Penha-Gonçalves C, Leijon K, Holmberg D. Low rate of proliferation in immature thymocytes of the non-obese diabetic mouse maps to the Idd6 diabetes susceptibility region. *Diabetologia* 2001;44:1054–1061
7. Rogner UC, Lepault F, Gagnerault MC, et al. The diabetes type 1 locus Idd6 modulates activity of CD4+CD25+ regulatory T-cells. *Diabetes* 2006;55:186–192
8. Vallois D, Gagnerault MC, Avner P, et al. Influence of a non-NK complex region of chromosome 6 on CD4+ invariant NK T cell homeostasis. *J Immunol* 2008;181:1753–1759
9. Grimm CH, Rogner UC, Avner P. Lrmp and Bcat1 are candidates for the type I diabetes susceptibility locus Idd6. *Autoimmunity* 2003;36:241–246
10. Hung MS, Avner P, Rogner UC. Identification of the transcription factor ARNTL2 as a candidate gene for the type 1 diabetes locus Idd6. *Hum Mol Genet* 2006;15:2732–2742
11. Duarte N, Lundholm M, Holmberg D. The Idd6.2 diabetes susceptibility region controls defective expression of the Lrmp gene in nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunogenetics* 2007;59:407–416
12. Vallois D, Grimm CH, Avner P, Boitard C, Rogner UC. The type 1 diabetes locus Idd6 controls TLR1 expression. *J Immunol* 2007;179:3896–3903
13. Steward CA, Gonzalez JM, Trevanion S, et al. The non-obese diabetic mouse sequence, annotation and variation resource: an aid for investigating type 1 diabetes. *Database (Oxford)* 2013;2013:bat032
14. He CX, Avner P, Boitard C, Rogner UC. Downregulation of the circadian rhythm related gene Arntl2 suppresses diabetes protection in Idd6 NOD.C3H congenic mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:1154–1158
15. He CX, Prevot N, Boitard C, Avner P, Rogner UC. Inhibition of type 1 diabetes by upregulation of the circadian rhythm-related aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2. *Immunogenetics* 2010;62:585–592
16. Attia M, Rachez C, De Pauw A, Avner P, Rogner UC. Nap1l2 promotes histone acetylation activity during neuronal differentiation. *Mol Cell Biol* 2007;27:6093–6102
17. Ostiguy V, Allard EL, Marquis M, Leignadier J, Labrecque N. IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J Leukoc Biol* 2007;82:645–656
18. Suto A, Kashiwakuma D, Kagami S, et al. Development and characterization of IL-21-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 2008;205:1369–1379
19. Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14028–14033
20. McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodström-Tullberg M, Sprent J, King C. Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19438–19443
21. McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, et al. Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes* 2011;60:867–875
22. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, et al. Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009;58:1144–1155
23. Scheiermann C, Kunisaki Y, Frenette PS. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 2013;13:190–198

## SUPPLEMENTARY DATA

### List of primers for quantitative RT-PCR

Arntl2: R: AGTTATGAACTCAGCCGGTCTCA; F: GTGGCTATGGGACGGTTGC  
AW112010: R: TCTCTCCTGAACGACCCAGT; F: GCCATCAAGCCAATGATGTA  
Car2: R: GGCAGGTCCAATCTTCAAAA; F: TGGTTCACCTGGAACACCAAA  
Ccl19: R: CACCACACTAAGGGGCTATCA; F: GCCTTTGTTCTTGGCAGAAG  
Cox7c: R: ATAAAGAAAGGTGCGGCCAAA; F: GGGGAAGAATTTGCCATTTT  
Eraf: R: GAAACTGGCTGCCCAGAGTA; F: TACAAGAAGCTCGTGCATGG  
Gag: R: GCGGGAAGTGTCTCTGTCTC; F: TTGTGGCCCATTTCTGTATCA  
Hmgb1: R: CTTCACTTGGCAGCTTTCT; F: CCATTGGTGATGTTGCAAAG  
H2T22: R: TCGGCTTCTAGTCAGGCATT; F: CACTGAGGGTAGGACCCAGA  
Il21: R: TACACCAGTGGCAACCTTCA; F: GCTCAAGACTCAGCCAGTCC  
Il22: R: TCTGGATGTTCTGGTCGTCA; F: AGACAGGTTCCAGCCCTACA  
Rnu2: R: GCAAGCTCCTATTCCAACCTCC; F: GGCCTTTTGGCTAAGATCAAG  
Rpl17: R: TCCCGGGTGTCTTAAAGTG; F: GCCAAGATGGTTCGCTACTC  
Rpl29: R: TGCATCTTCTTCAGGCCTTT; F: AACCACGGTCGCAAAGATAC  
Rps8: R: GGACAAGCTCGTTGTTGGAT; F: TTGGATGTGGGGAACCTTTTC  
Serpib9: R: AGGATGCTGGAGCCAGTAGA; F: GGACATTTCCCACCACTCAC  
Tmed2: R: TGCCTATCACTGCAAGCAAC; F: CCCTTGTTGGCACTTAGGAA  
Arnt: R: TGGAAGTGCCTGTGGTCTG; F: TGCCTCATCTGGTACTGCTG  
Arntl1: R: GCAGTGCCACTGACTACCAAGA; F: TCC TGG ACA TTG CAT TGC AT  
Clock: R: AGGCACAGACATTATCCG; F: ACCGTCTCATCAAGGGAC  
Per1: R: CAGGCTAACCAGGAATATTACCAGC; F: CACAGCCACAGAGAAGGTGTCCTGG  
Per2: R: CCAAATGCGGTGGTGTAGTTT; F: AGAAAAGCCCTGCTGTTCCA

### List of primers for quantitative ChIP-PCR

Arntl2-1: R: CTGGGTGGATCTCCGAACATA; F: TTGCGAGTGATAGGAACAGCAGCT  
Arntl2-2: R: AGAAAAGGGTCAGGACCACA; F: TTTTCCTCTTGCCCTTCCAG  
Arntl2-3: R: CTGCAGCTCCAGGTGAGTG; F: CCATTACAAGCTGGAGGAGG  
Arntl2-4: R: CAGCGCAGTTGTATCACCTC; F: TGCTCCTCTCTGGAAGAAGC  
Arntl2-5: R: CTCCCTGGGAACATGGTG; F: GCATGGAAGTCAAGGTCACA  
Arntl2-6: R: TTTCAAGGGTTCCTGTGGTC; F: CACTCTCTTCTGGGTGCCTC  
Arntl2-7: R: CCAGAACCCTTGGAGCTAGA; F: TCTCACCTCCTCCCCCTTCTC  
Arntl2-8: R: CTGTTCCCTCCCAGCTTTTCA; F: TGGAGAGATGGATTGGTGGT  
Arntl2-9: R: GGCAAGACACACAATGTTGG; F: GTGTGTGTGTGGTGCTGCT  
Arntl2-10: R: TCTCTGAGCTCCATTTTCTCTC; F: ACAAACCTGTGGGGACCATTC  
Arntl2-11: R: ACCCCTTCCACCTCTGATTC; F: TTGCTAAAGTGTGCACAGGG  
  
Il21Am1: R: AGGTTAGGAGTGGGGCTTGT; F: ACGCTGCTGCGAGAACTTAT  
Il21Am2: R: CTTCTGAGCCTTTTACCAG; F: CTAGGGCTGTGCTGGCTACT  
Il21Am3: R: CGGAGAGCACGCTGTCTACT; F: AGCACTAATGGTGCCTCCTG  
Il21Am4: R: CACGCACACGTACACCTAGC; F: CATTGCAGCCTGGAAATCTT  
Il21E1: R: AGTTCTGGTGGCATGGAGAG; F: CTAATCAGGAGGCGATCTGG  
Il21E3: R: CCTGTTTTTCAAGAAGGCCAAA; F: TGTTTTCTTCTCCCTCCT  
Il21E5-1: R: GTTCCCTGCACAGACTCCAT; F: GAAGCACCAGAAATCCCTGA  
Il21E5-2: R: TCCTCCCAATGTCAAGTTCC; F: TGAGGTTTGCACCTCCACAG  
Il21E5-3: R: AACAAGCAGAGATCCCGTGT; F: ATGCGTTGGTTCTGATTGTG  
Il21E5-4: R: ATCGTTTGGAAAAGCCAGTG; F: GGTTCAGACTGCTGTGCAA  
Il21E5-5: R: AGGTTGCCACTGGTGTAAAGC; F: CGGCCATAACTGATTTCTC  
Il21Av1: R: GGTTACCAGGCTGTGCTCAT; F: AGAATCCTCCCCACTGAGGT  
Il21Av2: R: ACATAGTGCCTCCACCTGCT; F: TTAAAATGCTCCCCAAGGTG

# SUPPLEMENTARY DATA

II21Av3: R: CCAAGTTTCCCTGCCACTTA; F: AGACCAATGTGCCTGGAGTC

Arpo: R: TCC AGA GGC ACC ATT GAA ATT; F: TC GCT GGC TCC CAC CTT

**Supplementary Table 2.** Total number of cells in  $10^6$  splenocytes

Strain	CD4 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> T cells	B cells	CD11c <sup>+</sup> cells	CD4 <sup>+</sup> T cells				
					IL21 <sup>+</sup>	IL17 <sup>+</sup>	IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	IL4 <sup>+</sup>	Fox P3 <sup>+</sup>
6.VIIIa	210046* (+/- 20750)	156457* (+/- 18752)	416400* (+/- 20057)	20580* (+/- 3730)	2100* (+/- 567)	1552* (+/- 407)	2785 (+/- 1050)	1973* (+/- 316)	11569 (+/- 3295)
6.VIIIc	156800* (+/- 27395)	142380* (+/- 20494)	508000* (+/- 37047)	29920* (+/- 3838)	947* (+/- 289)	824* (+/- 254)	2284 (+/- 304)	1014* (+/- 171)	11516 (+/- 2824)

Total number of cells in  $10^6$  thymocytes

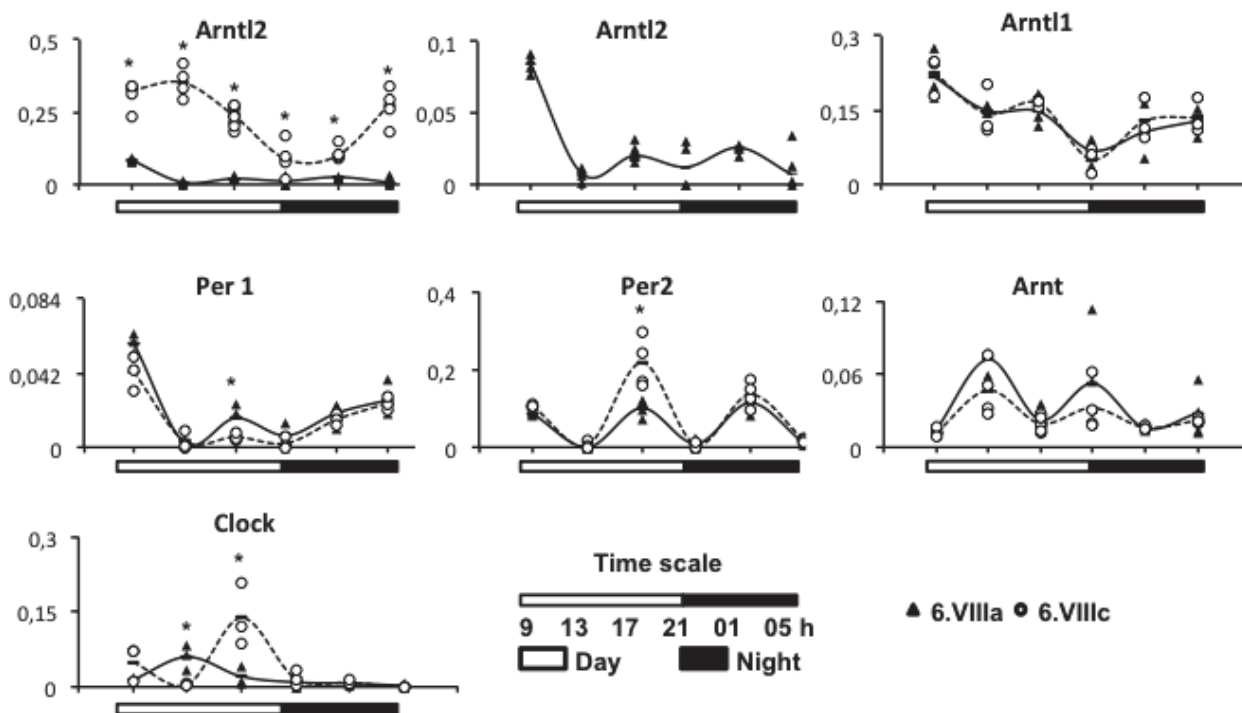
Strain	CD4 <sup>+</sup> T cells	CD8 <sup>+</sup> T cells	CD4 <sup>+</sup> T cells				
			IL21 <sup>+</sup>	IL17 <sup>+</sup>	IFN $\gamma$ <sup>+</sup>	IL4 <sup>+</sup>	Fox P3 <sup>+</sup>
6.VIIIa	58168 (+/- 14506)	53781 (+/- 14400)	737* (+/- 196)	338* (+/- 19)	261 (+/- 147)	594* (+/- 187)	3002 (+/- 945)
6.VIIIc	40362 (+/- 16722)	47909 (+/- 3284)	298* (+/- 76)	167* (+/- 33)	313 (+/- 149)	236* (+/- 51)	3572 (+/- 913)

Numbers of cells in  $10^6$  splenocytes or thymocytes (n= 9 females 4-6 six weeks old, \*= $P<0.05$ ). The average number of splenocytes for strain 6.VIIIa was  $5.2 \times 10^7$  cells +/-  $4 \times 10^6$  and for strain 6.VIIIc  $5.6 \times 10^7$  +/-  $5 \times 10^6$ , the number of thymocytes for 6.VIIIa was  $0.95 \times 10^7$  cells +/-  $2 \times 10^5$  and for 6.VIIIc  $1.02 \times 10^7$  +/-  $8 \times 10^5$ .

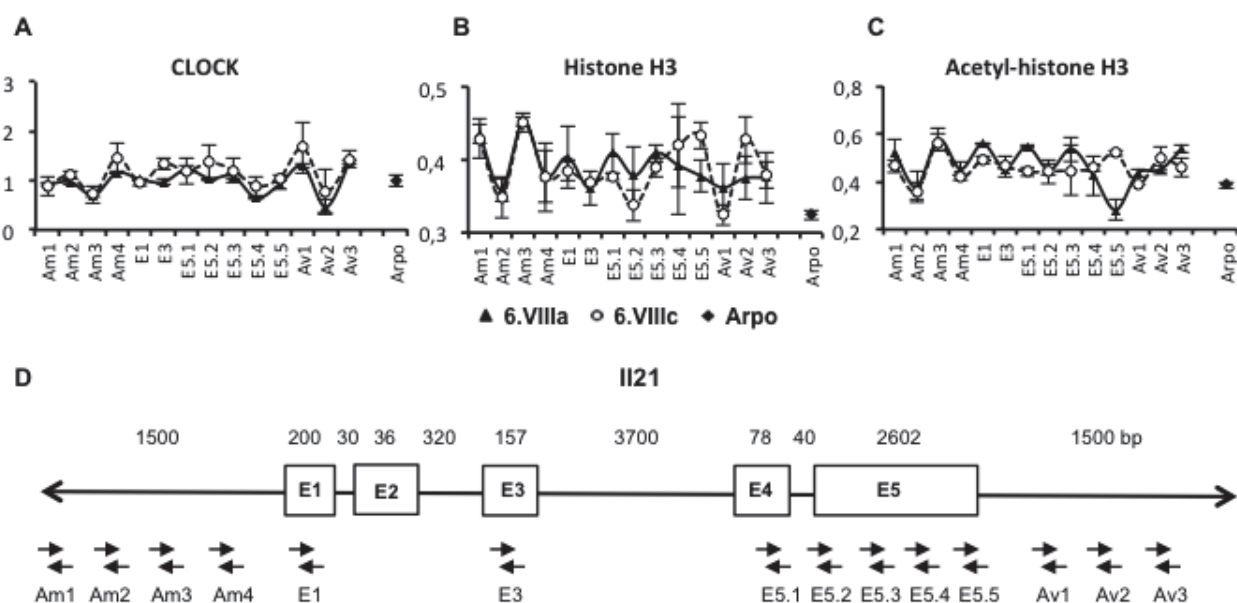


## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Figure 1.** Expression of circadian genes in splenic CD4<sup>+</sup> T cells of strains 6.VIIIa (black triangles) and 6.VIIIc (open circles). n=4 females at 6-8 weeks of age, \*=  $P < 0.05$ .

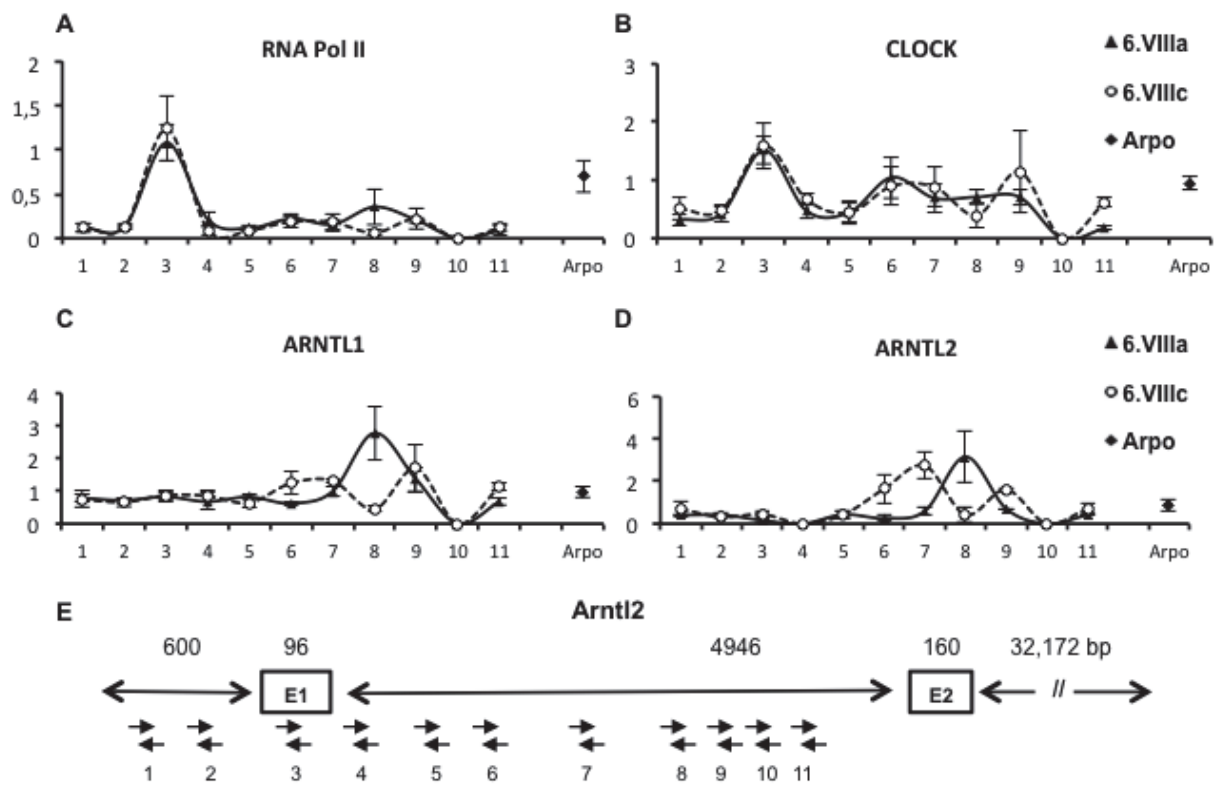


**Supplementary Figure 2.** Analysis by ChIP-Q-PCR of the binding on the *Il21* gene of A) CLOCK, 3 experiments +/- SE; Histone H3 (B) and acetyl-Histone H3 (C), 1 experiment +/- SD. D) Structure of the *Il21* gene and primer localisation.



## SUPPLEMENTARY DATA

**Supplementary Figure 3.** ChIP-Q-PCR analysis of the binding on the *Arntl2* gene of A) RNA Pol II, B) CLOCK, C) ARNTL1 and D) ARNTL2 (3 experiments +/- SE). E) Representation of the structure of the 5' region of the *Arntl2* gene and primer localisation. Results are compared to those for the transcription start site of *Arpo*.



## **II. Review: Circadian rhythm related genes: implication in autoimmunity and type 1 diabetes**

Basile Lebailly, Christian Boitard, Ute Christine Rogner (2015) Diabetes, Obesity and Metabolism (sous presse)

Il est maintenant reconnu que les travailleurs de nuit ont un risque plus élevé de développer un diabète. Les études d'association et de fonction de gènes récentes ont directement prouvé l'implication de plusieurs gènes liés au rythme circadien dans cette maladie. Le diabète a été associé à des variations de régulation de l'horloge circadienne centrale et aux oscillations périphériques. Plusieurs régulateurs transcriptionnel ont été identifiés. Les gènes circadiens sont clairement impliqués dans les mécanismes métaboliques, les fonctions pancréatiques et le diabète de type 2. Beaucoup moins de liens ont été trouvés entre la régulation circadienne et le diabète de type 1. Cependant l'hypothèse que les gènes circadiens soient aussi impliqués dans le diabète de type 1 est appuyée par la découverte des variations circadiennes du système immunitaire et par le fait que plusieurs maladies auto-immunes sont associées à des gènes circadiens. Des découvertes récentes sur la souris non-obèse diabétique ont permis de mettre en avant des mécanismes spécifiques par lesquels des gènes liés au rythme circadien pourrait contrôler le système immunitaire lors d'un diabète de type 1.



# **Circadian rhythm related genes: implication in autoimmunity and type 1 diabetes**

**Basile Lebailly<sup>1,2</sup>, Christian Boitard<sup>1</sup>, Ute Christine Rogner<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Bâtiment Cassini

123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France

<sup>2</sup> University Pierre and Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, 25 rue du Docteur Roux,

75015 Paris, France

Corresponding author:

Ute C. Rogner

Email: [ute.rogner@inserm.fr](mailto:ute.rogner@inserm.fr)

Phone : +33 1 76 53 55 89

**Running title:** Circadian genes in type 1 diabetes

**Keywords:** Type 1 diabetes, immune system, circadian rhythm, transcription factor, cytokine

## Abstract

Recent gene association and functional studies have proven the implication of several circadian rhythm related genes in diabetes. Diabetes has been related to variation in central circadian regulation and peripheral oscillation. Different transcriptional regulators have been identified. Circadian genes are clearly implicated in metabolic pathways, pancreatic function and in type 2 diabetes. Much less evidence has been shown for the link between circadian regulation and type 1 diabetes. The hypothesis that circadian genes are involved in type 1 diabetes is reinforced by findings that the immune system undergoes circadian variation and that several autoimmune diseases are associated with circadian genes. Recent findings in the non-obese diabetic mouse model pinpoint to specific mechanisms controlling type 1 diabetes by the clock-related gene *Arntl2* in the immune system.

## Callouts

Present data suggest a strong link between the circadian rhythm and diabetes. Studies performed in the 1960s-70s indicated that the immune system undergoes circadian variation and many other examples have been published since.

The human clock-related *ARNTL2* gene encodes a basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS domain transcription factor and its transcript exhibits an ubiquitous expression pattern with multiple splice variants.

The *Arntl2* gene has been discovered as a candidate gene for type 1 diabetes within the *Idd6* locus of the non-obese diabetic (NOD) mouse. ARNTL2 regulates interleukin-21 transcription in CD4<sup>+</sup> T cells. IL-21 is a cytokine involved in type 1 diabetes development.

## Main text

### Circadian genes and diabetes

There is growing evidence about the implication of the circadian rhythm in diabetes development [177]. Studies in mice have shown that the disruption of circadian rhythms can accelerate diabetes and  $\beta$ -cell loss [178]. In humans a link between the central circadian rhythm regulation and glucose homeostasis has been suggested findings such as the polymorphism in *MTNR1B*, encoding the melatonin receptor 1B, that increases the risk for type 2 diabetes [210].

Transcription and translation of core clock components Circadian Locomotor Output Cycles Kaput (CLOCK), Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 1 (ARNTL1), Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2 (ARNTL2), Period circadian proteins (PER1, PER2, PER3) and Cryptochromes (CRY1 and CRY2) play a pivotal role in rhythm generation in the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is the site of the master circadian oscillator in mammals, but also in the control of peripheral oscillations.

The direct relation of *CLOCK*-related genes in diabetes has already been shown [179]. *ARNTL1*, which is also called brain and muscle ARNT-like 1 (*BMAL1*) or member of PAS superfamily 3 (*MOP3*), has been genetically linked to hypertension and type 2 diabetes in human [180]. Knockout mice for *Arntl1* and *Clock* exhibited a role for the  $\beta$ -cell clock in coordinating insulin secretion with the sleep-wake cycle, and revealed that ablation of the pancreatic clock can trigger the onset of diabetes mellitus [181]. The major circadian pacemaker *ARNTL1* has in addition been associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus [182]. CRY, another component of the core clock, is required for the regulation of inflammatory cytokines via the NF-kappaB pathway [183]. Absence of this key circadian clock component leads to the activation of this signalling system and elevated levels of inflammatory molecules in the body. Low-grade constant inflammation could be the underlying cause of chronic diseases such as diabetes. Further examples of the involvement of *CLOCK*-related genes include the *PER3* length polymorphism discovered in patients with type 2 diabetes mellitus [184].

Other homologous genes of the family of basic helix-loop-helix transcription factors, such as the dioxin-receptor encoding gene *AHR* [185], *ARNT* [159] have been associated to diabetes. The Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) is a cytosolic transcription factor that is normally inactive, bound to several co-chaperones. Upon ligand binding to chemicals such as 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), the chaperones dissociate resulting in AHR translocating into the nucleus and dimerizing with ARNT (AhR Nuclear Translocator), leading to changes in gene transcription. Activation of the AHR has long been known to cause immunotoxicity, including thymic involution. More recent data suggested a role for the AHR in regulatory T-cell (Treg) and T-helper 17 (Th17) cell development [186, 187]. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by the dioxin TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells in pancreatic lymph nodes [185].

The aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (*ARNT*) gene is a positional and functional candidate for type 2 diabetes [211]. Using oligonucleotide microarrays and real-time PCR of pancreatic islets isolated from humans with type 2 diabetes versus normal glucose-tolerant controls, a 90% decrease in expression of the transcription factor ARNT, also called Hypoxia Inducible Factor 1  $\beta$  (HIF1 $\beta$ )), has been identified. ARNT knockout mice exhibited abnormal glucose tolerance, impaired insulin secretion, and changes in islet gene expression that mimicked those in human diabetic islets. These data suggested an important role for decreased ARNT and altered gene expression in the impaired islet function of human type 2 diabetes. ARNT regulates many  $\beta$ -cell genes, insulin secretion and glucose tolerance [159].

Taken together, the present data suggest a strong link between diabetes and the circadian rhythm via a number of different gene pathways, including those that implicate insulin metabolism and immune regulation.

### **Circadian genes and the immune system**

Already studies performed in the 1960s and 1970s indicated that the reaction of the immune system to pathogens undergoes circadian variation (reviewed in [194]). These early studies also showed circadian variation of specific immune cell types and their activity, for example the variation of mitotic activity and cell degeneration in the mouse thymus over a period of 24 hours [195, 196]. Many other examples have been published

since, some of which concern highly specific immune functions. Recent studies showed for example that Th17 differentiation is controlled by the circadian clock [197], that the circadian gene *Bmal1* regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. [198], or that the circadian clock protein CRY regulates the expression of proinflammatory cytokines [183].

In this context it does not seem surprising that autoimmune disease is influenced by the circadian rhythm. This observation has particularly been made in rheumatoid arthritis, where patients suffer more from stiffness and pain in morning than during other times of the day. This phenomenon has been attributed to the circadian regulation of cytokines (reviewed in [212]). Although the link has not been made as strongly for human type 1 diabetes, the hypothesis of circadian genes being involved in the disease appears rather justified.

### **The *ARNTL2* gene**

The *ARNTL2* (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2) gene is also known as *BMAL2* (brain and muscle ARNT-like 2), *PASD9* (PAS domain-containing protein 9), *MOP9* (member of PAS protein 9) or *CLIF* (Cycle-like factor). The cloning of *ARNTL2* has been described by Hogenesch et al. [213] under the name *MOP9*, by Maemura et al. [214] under the name *CLIF*, and by Okano et al. [215] and Ikeda et al. [216] under the name *BMAL2*.

By searching a human EST database for sequences similar to *BMAL1* (*ARNTL*), followed by PCR performed on fetal brain cDNA and RACE using adult brain cDNA, Ikeda et al. [216] cloned the *ARNTL2* gene, which they called *BMAL2*. The deduced 551-amino acid protein had an N-terminal bHLH domain, followed by PASA and PASB domains and a long C-terminal sequence. Ikeda et al. identified 2 putative nuclear localization signals near the N terminus. *BMAL2* shared 52% amino acid identity with zebrafish *Bmal2* and 49% identity with human *BMAL1*. By Northern blot analysis *BMAL2* transcripts of 7.0 and 8.0 kb were detected in adult liver and fetal brain. A 2.2-kb *BMAL2* transcript was also detected in adult liver. The authors detected no expression in adult heart, brain, pancreas, placenta, lung, liver, and kidney. A fluorescence-tagged *BMAL2* protein located predominantly in the nucleus of transfected HEK293 cells.

Hogenesch [213] mapped the gene to human chromosome 12p11.22-11.23. They described that *MOP9* displays significant homology to the *Drosophila* circadian factor *CYCLE* and the mammalian ortholog *MOP3/BMAL1*. *MOP9* was found to form a transcriptionally active heterodimer with the circadian *CLOCK* protein, the structurally related *MOP4*, and hypoxia-inducible factors, such as HIF1 $\alpha$ . They confirmed that *MOP9* was expressed in several brain regions such as the thalamus, hypothalamus, and amygdala. Like *CLOCK*, *MOP9* expression was found in the suprachiasmatic nucleus.

Using the Endothelial PAS domain-containing protein 1 (EPAS1) as bait in a yeast 2-hybrid screen of a human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) cDNA library, Maemura et al. [214] also cloned *ARNTL2*, which they called *CLIF*. The deduced 602-amino acid protein contained a bHLH/PAS domain and shares 44.1% identity with *Drosophila* *Cycle* and 44.9% identity with human *BMAL1*. It differed from the *BMAL2* protein reported by Ikeda et al. [216] at its N terminus. Northern blot analysis detected widespread and variable expression of *CLIF* transcripts of 8, 6, 2.4, and 2.2 kb. Highest

*CLIF* expression was detected in brain and placenta. In situ hybridization revealed expression of *CLIF* transcripts in endothelial cells of human heart, lung, and kidney and in endothelial cells and neurons of brain.

The Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) is the major physiologic inhibitor of tissue-type plasminogen activator in plasma, and is elevated in a variety of clinical situations that are associated with increased risk of ischemic cardiovascular events. Maemura et al. [214] showed that in endothelial cells, CLIF formed a heterodimer with CLOCK and upregulated the plasminogen activator inhibitor-1 (*PAI-1*) gene through E-box sites. PER2 and CRY1 inhibited the *PAI-1* promoter activation by the CLOCK:CLIF heterodimer. These results suggested that CLIF regulates the circadian oscillation of *PAI-1* gene expression in endothelial cells. Schoenhard et al. studied further this interaction [217]. They described that the CLOCK:BMAL1 and CLOCK:BMAL2 heterodimers made additive contributions to *PAI-1* gene transcription. The abilities of these heterodimers to activate gene expression differed by twofold. The susceptibilities of these circadian activators to inhibition by PER and CRY proteins were however found equivalent and redox independent. Schoenhard et al. hypothesized that the different BMAL1 and BMAL2 spatiotemporal distributions allowed intrinsic circadian clocks to modulate the amplitudes of their oscillators whilst they maintained circadian periodicity. In this way, the fundamental circadian clock components were thought to drive circadian variation in *PAI-1* expression, which in turn could then influence the pathogenesis of acute atherothrombotic events.

Takeda et al [218] described the regulation of thrombomodulin (TM) by the CLOCK:BMAL2 dimer. Again, this confirmed that cardiovascular diseases are closely related to circadian rhythm under control of an internal biological clock mechanism.

The studies showed that the human *ARNTL2* gene encodes a basic helix-loop-helix (bHLH)/PAS domain transcription factor with a probably ubiquitous expression pattern and with strong expression in the brain. Strikingly, the studies showed multiple splice variants of the gene transcript [219].

Apart from being potentially involved in transcriptional regulation, *ARNTL2* has been found to control cellular proliferation. Overexpression of antisense *ARNTL2* RNA in human 293EBNA cells resulted in reduced cell cycle time, increased plating efficiency in soft agar, diminished TNF-alpha-induced increment of CPP32/caspase-3 activity, and a reduced proportion of cells in the G2 phase with a concomitantly increased proportion of cells in the S phase [220]. The authors concluded that the frequent downregulation of *ARNTL2* is related to hepatocellular carcinoma (HCC).

Okano et al. [215] cloned cDNAs encoding mouse and rat *Bmal2* (*mBmal2* and *rBmal2*) from mouse midbrain and rat-1 fibroblast cells, respectively. Their phylogenetic analysis suggested that vertebrate *Bmal1* and *Bmal2* genes were generated by a single gene duplication of an ancestral *Bmal* gene, a vertebrate ortholog of *dCyc* gene. The authors described that BMAL2 proteins have diverged about 20-fold more rapidly than BMAL1 proteins after the duplication, suggesting an as-yet-unidentified function conserved in BMAL1 but not in BMAL2. *mBmal2* mRNA was constitutively expressed throughout the day under light-dark cycle in the mouse hypothalamus containing suprachiasmatic nucleus. Sasaki et al. [221] used murine NIH3T3 cells and showed that like in human [217] the BMAL2-CLOCK activity was inhibited by PER2 pointing to a negative and positive role of BMAL2 in circadian transcription.

*Arntl2* is considered as a paralog to *Arntl*, and both are homologs of the *Drosophila* gene *Cycle*. Further homologs were isolated in several other species such as fish [222] and birds [215, 223, 224]. Large scale sequencing projects identified *Arntl2* homologs in lizards (*Anolis carolinensis*) and the tropical clawed frog (*Xenopus tropicalis*).

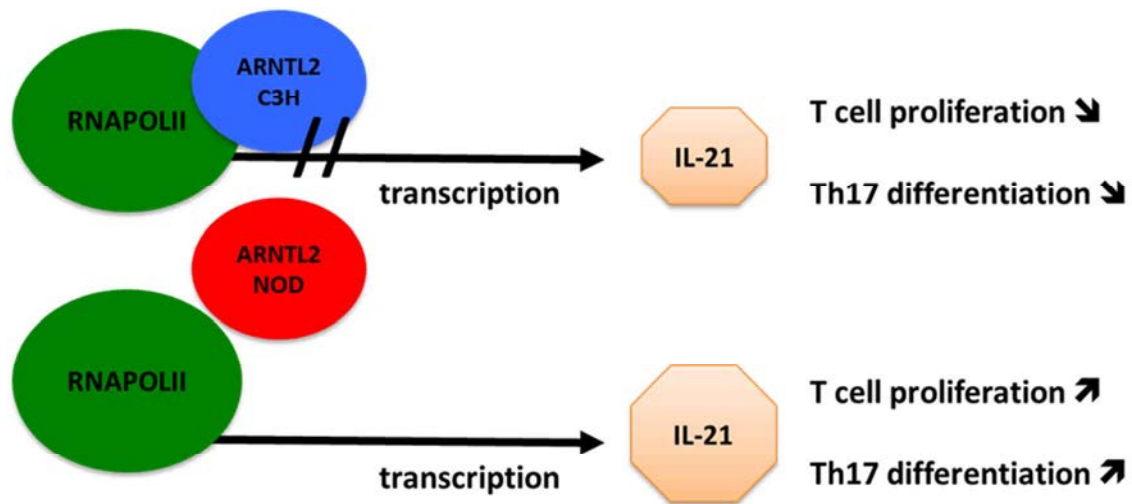
### **ARNTL2 expression and disease**

Genetic drifts in *ARNTL2* polymorphisms have been described in the human population leading to variation in the circadian rhythm regulation [225]. The murine *ARNTL2* can rescue many of the *ARNTL1* functions in the suprachiasmatic nucleus [192], but also essential functions of *ARNTL1* in controlling obesity and type 2 diabetes [193]. The *ARNTL2* gene has been associated with a number of human diseases. *ARNTL2* is a candidate for many human brain disorders including anxiety disorders [226], Parkinson disease [227], alcohol use disorders [228], and bipolar disorder [229]. The gene has been described as a candidate in cancer, e.g. kidney cancer [230], colorectal cancer [231], and hepatocellular carcinoma (HCC) [220]. Finally, *ARNTL2* has also been described as being related to rheumatic arthritis [232]. The study showed that throughout the *ex vivo* experiments *ARNTL2* and *NPAS2* were the most affected clock genes in human immune-inflammatory conditions and that the molecular machinery controlling the circadian rhythm is disturbed in rheumatoid arthritis patients.

### ***Arntl2* is a candidate gene for type 1 diabetes**

The *Arntl2* gene has been discovered as a candidate gene for type 1 diabetes within the *Idd6* locus of the non-obese diabetic (NOD) mouse [158]. The gene is downregulated in NOD mice compared to other non-diabetic mouse strains and numerous polymorphisms between these strains have been discovered [233]. Further functional studies confirmed the candidate gene and showed that *ARNTL2* controls proliferation of peripheral CD4(+) T cells and diabetes development [208, 209]. It has also been shown that *ARNTL2* binds to the promoter of the interleukin-21 (*Il-21*) gene, which itself controls the proliferation of immune cells [62]. *Il-21* is located in the type 1 diabetes locus *Idd3* [66]. The interaction is absent in the NOD mouse but present in non-diabetic mouse strains (C57BL/6, C3H/HeJ). This leads to an upregulation of *Il-21* in the NOD mouse. *ARNTL2* appears to control *Il-21* expression without interaction with other circadian factors such as CLOCK or BMAL1 (**Figure 1**) [234].

These data point to a novel mechanism controlling type 1 diabetes development independent of other known regulatory pathways. Interestingly, *Il-21* has also been associated to human type 1 diabetes [235], and recent findings confirmed that IL-21 producing cells [236] are increased in type 1 diabetes patients. These data provide some indications that the *ARNTL2* pathway could be conserved between the two species.



**Figure 1:** Current model for the *Il-21* regulation by ARNTL2. ARNTL2 expressed from C3H alleles can bind to the *Il-21* promoter and inhibits transcription but not RNA polymerase II binding. The NOD derived protein cannot bind, leading to high transcriptional levels of *Il-21*, increased numbers of IL-21 producing cells, and finally to increased numbers of T cells and Th17 cells.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no conflicts of interest.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge financial support of their work by Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), EFSD/JDRF/Novo Nordisk Programme, CORDDIM and by recurrent funding from the CNRS, INSERM and Institut Pasteur.

## References

- [1] Feng D, Lazar MA. Clocks, metabolism, and the epigenome. *Mol Cell* 2012; **47**: 158-167.
- [2] Gale JE, Cox HI, Qian J, Block GD, Colwell CS, Matveyenko AV. Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction. *J Biol Rhythms* 2011; **26**: 423-433.
- [3] Bouatia-Naji N, Bonnefond A, Cavalcanti-Proenca C et al. A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk. *Nat Genet* 2009; **41**: 89-94.
- [4] Ko CH, Takahashi JS. Molecular components of the mammalian circadian clock. *Hum Mol Genet* 2006; **15 Spec No 2**: R271-277.
- [5] Woon PY, Kaisaki PJ, Braganca J et al. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; **104**: 14412-14417.
- [6] Marcheva B, Ramsey KM, Buhr ED et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. *Nature* 2010; **466**: 627-631.
- [7] Pappa KI, Gazouli M, Anastasiou E, Iliodromiti Z, Antsaklis A, Anagnostou NP. The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2013; **99**: 151-157.
- [8] Narasimamurthy R, Hatori M, Nayak SK, Liu F, Panda S, Verma IM. Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; **109**: 12662-12667.
- [9] Karthikeyan R, Marimuthu G, Sooriyakumar M et al. Per3 length polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Horm Mol Biol Clin Investig* 2014; **18**: 145-149.
- [10] Kerkvliet NI, Stepan LB, Vorachek W et al. Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes. *Immunotherapy* 2009; **1**: 539-547.
- [11] Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S et al. Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 2005; **122**: 337-349.
- [12] Quintana FJ, Basso AS, Iglesias AH et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2008; **453**: 65-71.
- [13] Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008; **453**: 106-109.
- [14] Das SK, Sharma NK, Chu WS, Wang H, Elbein SC. Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene as a positional and functional candidate for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits: Mutation detection, case-control studies, and gene expression analysis. *BMC Med Genet* 2008; **9**: 16.
- [15] Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity* 2014; **40**: 178-186.
- [16] Kirk H. Mitotic activity and cell degeneration in the mouse thymus over a period of 24 hrs. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 1972; **129**: 188-195.
- [17] Alvarez JD, Sehgal A. The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression. *J Biol Rhythms* 2005; **20**: 111-121.
- [18] Yu X, Rollins D, Ruhn KA et al. TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock. *Science* 2013; **342**: 727-730.



- [19] Nguyen KD, Fentress SJ, Qiu Y, Yun K, Cox JS, Chawla A. Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes. *Science* 2013; **341**: 1483-1488.
- [20] Gibbs JE, Ray DW. The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2013; **15**: 205.
- [21] Hogenesch JB, Gu YZ, Moran SM et al. The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors. *J Neurosci* 2000; **20**: RC83.
- [22] Maemura K, de la Monte SM, Chin MT et al. CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem* 2000; **275**: 36847-36851.
- [23] Okano T, Sasaki M, Fukada Y. Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication. *Neurosci Lett* 2001; **300**: 111-114.
- [24] Ikeda M, Yu W, Hirai M et al. cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **275**: 493-502.
- [25] Schoenhard JA, Smith LH, Painter CA, Eren M, Johnson CH, Vaughan DE. Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2. *J Mol Cell Cardiol* 2003; **35**: 473-481.
- [26] Takeda N, Maemura K, Horie S et al. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 32561-32567.
- [27] Schoenhard JA, Eren M, Johnson CH, Vaughan DE. Alternative splicing yields novel BMAL2 variants: tissue distribution and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; **283**: C103-114.
- [28] Yeh CT, Lu SC, Tseng IC et al. Antisense overexpression of BMAL2 enhances cell proliferation. *Oncogene* 2003; **22**: 5306-5314.
- [29] Sasaki M, Yoshitane H, Du NH, Okano T, Fukada Y. Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription. *J Biol Chem* 2009; **284**: 25149-25159.
- [30] Cermakian N, Whitmore D, Foulkes NS, Sassone-Corsi P. Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; **97**: 4339-4344.
- [31] Lazado CC, Kumaratunga HP, Nagasawa K, Babiak I, Caipang CM, Fernandes JM. In vitro and ex vivo models indicate that the molecular clock in fast skeletal muscle of Atlantic cod is not autonomous. *Mol Biol Rep* 2014; **41**: 6679-6689.
- [32] Lazado CC, Kumaratunga HP, Nagasawa K, Babiak I, Giannetto A, Fernandes JM. Daily rhythmicity of clock gene transcripts in atlantic cod fast skeletal muscle. *PLoS One* 2014; **9**: e99172.
- [33] Ciarleglio CM, Ryckman KK, Servick SV et al. Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations. *J Biol Rhythms* 2008; **23**: 330-340.
- [34] Shi SQ, Ansari TS, McGuinness OP, Wasserman DH, Johnson CH. Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity. *Curr Biol* 2013; **23**: 372-381.
- [35] Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, Johnson CH. Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2. *Curr Biol* 2010; **20**: 316-321.
- [36] Partonen T. Clock gene variants in mood and anxiety disorders. *J Neural Transm* 2012; **119**: 1133-1145.

- [37] Ding H, Liu S, Yuan Y, Lin Q, Chan P, Cai Y. Decreased expression of Bmal2 in patients with Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2011; **499**: 186-188.
- [38] Kovanen L, Saarikoski ST, Haukka J et al. Circadian clock gene polymorphisms in alcohol use disorders and alcohol consumption. *Alcohol Alcohol* 2010; **45**: 303-311.
- [39] Shi J, Wittke-Thompson JK, Badner JA et al. Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; **147B**: 1047-1055.
- [40] Mazzocchi G, Piepoli A, Carella M et al. Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients. *Biomed Pharmacother* 2012; **66**: 175-179.
- [41] Mazzocchi G, Pazienza V, Panza A et al. ARNTL2 and SERPINE1: potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2012; **138**: 501-511.
- [42] Kouri VP, Olkkonen J, Kaivosoja E et al. Circadian timekeeping is disturbed in rheumatoid arthritis at molecular level. *PLoS One* 2013; **8**: e54049.
- [43] Hung MS, Avner P, Rogner UC. Identification of the transcription factor ARNTL2 as a candidate gene for the type 1 diabetes locus Idd6. *Hum Mol Genet* 2006; **15**: 2732-2742.
- [44] Steward CA, Gonzalez JM, Trevanion S et al. The non-obese diabetic mouse sequence, annotation and variation resource: an aid for investigating type 1 diabetes. *Database (Oxford)* 2013; **2013**: bat032.
- [45] He CX, Avner P, Boitard C, Rogner UC. Downregulation of the circadian rhythm related gene Arntl2 suppresses diabetes protection in Idd6 NOD.C3H congenic mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010; **37**: 1154-1158.
- [46] He CX, Prevot N, Boitard C, Avner P, Rogner UC. Inhibition of type 1 diabetes by upregulation of the circadian rhythm-related aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2. *Immunogenetics* 2010; **62**: 585-592.
- [47] Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ. IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; **105**: 14028-14033.
- [48] McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodstrom-Tullberg M, Sprent J, King C. Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; **106**: 19438-19443.
- [49] Lebailly B, He C, Rogner UC. Linking the circadian rhythm gene Arntl2 to interleukin 21 expression in type 1 diabetes. *Diabetes* 2014; **63**: 2148-2157.
- [50] Asano K, Ikegami H, Fujisawa T et al. The gene for human IL-21 and genetic susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 2006; **1079**: 47-50.
- [51] Ferreira RC, Simons HZ, Thompson WS et al. IL-21 production by CD4(+) effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients. *Diabetologia* 2015; **58**: 781-790.

### **III. Article 2 : The circadian gene *Arntl2* controls interleukin-21 expression, thymocyte apoptosis and diabetogenic activity in the NOD mouse**

Basile Lebailly, Francina Langa, Philip Avner, Ute Christine Rogner

Les études réalisées sur la souris non-obèse diabétique (NOD) ont montré que des allèles NOD au locus *Idd6* du chromosome 6 confèrent une augmentation de la résistance à l'apoptose des thymocytes ainsi qu'une amplification de l'activité diabétogène des splénocytes. Le travail sur les lignées congéniques NOD.C3H a également démontré que ces deux phénotypes sont liés à l'intervalle *Idd6.3* de 700 kb contenant le gène candidat associé au diabète de type 1 : aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*Arntl2*). Le facteur de transcription ARNTL2 (également appelé Brain-Muscle-Arnt-Like-protein 2, BMAL2) est lié au rythme circadien et est capable de se lier au promoteur du gène codant pour l'interleukine-21 (*Il-21*) de façon allèle spécifique et de par cette liaison influence l'expression et le nombre de cellules T CD4<sup>+</sup> exprimant cette cytokine dans le thymus et la rate.

Des lignées de souris NOD.B6 *Arntl2*<sup>-/-</sup> nouvellement créées ont révélées qu'une inactivation d'*Arntl2* augmentait le nombre des cellules T CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>, l'apoptose des thymocytes et l'activité diabétogène des splénocytes.

Ces résultats suggèrent que le contrôle de l'expression d'*Il-21* par *Arntl2* corrèle avec la sélection thymique des cellules T ainsi qu'avec l'activité diabétogène des splénocytes.

**The circadian gene *Arntl2* controls interleukin-21 expression, thymocyte apoptosis and diabetogenic activity in the NOD mouse**

**Basile Lebailly<sup>1,2\*</sup>, Francina Langa<sup>3</sup>, Philip Avner<sup>1</sup>, Ute Christine Rogner<sup>1\*</sup>**

**Running title : *Arntl2* and thymocyte apoptosis**

**Word count: 2930, Figures: 6**

<sup>1</sup> Institut Pasteur, CNRS URA 2578, Mouse Molecular Genetics Laboratory, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

<sup>2</sup> University Pierre and Marie Curie, Cellule Pasteur UPMC, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

<sup>3</sup> Institut Pasteur, CNRS URA 2578, Mouse Genetics Engineering Center, 28 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

**\*Present address:**

Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR 8104, Bâtiment Cassini  
123, boulevard de Port-Royal, 75014 Paris, France

**Corresponding Author:**

Ute C. Rogner

Email: ute.rogner@inserm.fr

Phone : +33 1 76 53 55 89

## Abstract

In the non-obese diabetic (NOD) mouse, NOD alleles at the *Idd6* locus on chromosome 6 confer increased resistance to apoptosis in thymocytes and enhanced diabetogenic activity of splenocytes. Studies on NOD.C3H congenic strains suggest that both phenotypes are linked to the 700 kb *Idd6.3* interval containing the type 1 diabetes candidate gene aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*Arntl2*). ARNTL2 (Brain-Muscle-Arnt-Like-protein 2, BMAL2) is a circadian rhythm-related transcription factor that binds to the interleukin-21 (*Il-21*) promoter in an allele-specific manner and thereby influences its expression and the number of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T effector cells in thymus and spleen. Newly generated NOD.B6 *Arntl2*<sup>-/-</sup> mouse strains reveal that *Arntl2* inactivation increases CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T-cell numbers, thymocyte apoptosis and diabetogenic activity of splenocytes. These results suggest that the control of *Il-21* expression by *Arntl2* correlates with thymic T cell selection and diabetogenic activity of splenocytes.

The non-obese diabetic (NOD) mouse model has allowed the identification of more than 40 insulin dependent diabetes (*Idd*) loci controlling type 1 diabetes (T1D) development (1). The *Idd6* locus on distal chromosome 6 is a NOD susceptibility locus and protects against spontaneous diabetes when replaced by alleles from C57BL/6 (B6) or C3H/HeJ (C3H) mice (2-4). In independent studies, NOD alleles at *Idd6* have also been shown to decrease thymocyte apoptosis and proliferation (2; 5; 6).

Genetic dissection using NOD.C3H congenic strains revealed that the *Idd6.3* subinterval is responsible for the control of diabetes in splenocyte transfer assays (7). Compared to controls, splenocytes from NOD.C3H congenic mice with C3H alleles at *Idd6.3* transfer diabetes less efficiently, and these congenic mice exhibit lower numbers of interleukin-21 (IL-21) producing CD4<sup>+</sup> T cells in the spleen and thymus (8). The lower numbers of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells correlate strongly with decreased numbers of Th17 and Th2 effector cells. Gene expression studies suggested that the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2 (*Arntl2*) gene located in *Idd6.3* directly controls *Il-21* expression. The direct targeting of *Il-21* by ARNTL2 has been shown by chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in NOD.C3H congenic mice. These findings led to the hypothesis that the diabetogenic activity of *Idd6.3* splenocytes is controlled by ARNTL2 via the IL-21 pathway.

IL-21 is a type I cytokine controlling immune responses through interaction with the common  $\gamma$  chain ( $\gamma$ c) IL-21 receptor (IL-21R). IL-21 is mostly expressed by Th17 and Th2 subsets of CD4<sup>+</sup> T cells and acts on its target genes via activation of the Jak/Stat, MAPK and PI3K pathways (9-11). IL-21 target cells include T cells, B cells (12) and natural killer (NK) cells (13). High levels of IL-21 boost immune responses and can induce autoimmune reactions (14). In particular, IL-21 promotes T-cell survival and thus contributes to T-cell homeostasis and expansion (15). Moreover, IL-21 not only acts as an activator of effector T cells (16), but it also antagonizes the suppressive activity of regulatory T cells (17), an effect that is also

genetically controlled by *Idd6* (18). Finally, IL-21 controls recovery of thymocytes from apoptosis and is essential for the differentiation of Th17 cells in the thymus via the activation of the RAR-related orphan receptor gamma (ROR $\gamma$ ) pathway (19; 20). *Il-21* is a candidate gene for T1D and is located in the murine locus *Idd3* (10; 21; 22).

C3H and B6 alleles of *Arntl2* give rise to proteins that can bind to the RNA polymerase II binding site of the *Il-21* promoter, leading to reduced *Il-21* transcription. Conversely, NOD *Arntl2* alleles do not translate into proteins that bind to *Il-21*, thus leading to high *Il-21* expression. In the present work, we show that mutation of the B6 allele of *Arntl2* leads to increased numbers of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells in *Idd6* NOD.B6 congenic mice. This result confirms that *Arntl2* in *Idd6.3* is sufficient to regulate *Il-21*. Our results show that this transcriptional regulation of *Il-21* is already detectable in double-positive (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> thymocytes. The mutation in *Idd6* NOD.B6 mice leads to decreased levels of apoptosis at this cell stage. These results show that *Arntl2* is involved in both the thymic selection process and the control of the diabetogenic activity of splenocytes. Both may be directly linked through the transcriptional control of *Il-21*.

## Research Design and Methods

### *Construction of mouse strains*

NOD.C3H congenic mice for *Idd6* have been described previously (4; 7). The *Arntl2* mutant strain carries the allele *Arntl2*<sup>tm1a(KOMP)Wtsi</sup> and has been imported from the UCDavis KOMP Repository (Davis, CA). The C57BL/6-derived *Idd6* interval (D6Mit14 to D6Mit304) has been transferred to the NOD background by crossing females to the NOD/Lt strain, followed by 7 backcrosses and subsequent intercrossing to obtain homozygous mice. In parallel, *Idd6* NOD.B6 congenic mice were generated as controls. Three independent NOD.B6 lines each were tested and gave identical results.

Mutations in the coding region of exon 4 of the NOD derived *Arntl2* gene were created using the TALEN approach. The constructs pTAL.CMV-T7.012672 and pTAL.CMV-T7.013000, designed to target the sequences TCCAGGTCAGAATTCAT and GGAAAGTCTTCCCCAGA respectively, were provided and validated by Single Strand Annealing assay (Cellestis, Paris, France). *In vitro* transcribed RNA (6-10 ng; Ambion mMESSAGE mMACHINE Kit, Life Technologies, St. Aubin, France), was pronuclear injected into one-cell stage NOD embryos at the Institut Pasteur Transgenesis Facility (Paris, France). Out of 39 offsprings, two mutants were identified (5%). NT28 was a female carrying a 25bp deletion that removes the amino acids (AA)13 to 22 and introduces a 2bp frameshift. NT58 was a male carrying a deletion of AA22 and a conversion of the aspartic acid at AA23 to alanine, but leaving the rest of the gene unaffected. These heterozygous offsprings were crossed to NOD mice and rendered homozygous by intercrossing at the F2 generation.

Absence of protein in the knockout strains was validated by Western blotting using anti-ARNTL2 antibodies (ab86530; Abcam, Paris, France). Diabetes incidence monitoring and



diabetes transfer assays were performed as previously described (8; 18). All mice were kept at the Institut Pasteur mouse facility. All animal studies have been approved by the relevant institutional review boards (Comité d’Ethique en Expérimentation Animale CEEA 59, IDF, Paris and C2EA 89, Paris) under protocol numbers 2009-0015 and 2013-125.

### ***Flow cytometry analysis***

Expression of T-cell-specific proteins was analysed on a Cyan flow cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) after surface and/or intracellular staining using anti-mouse antibodies specific for CD4 (Alexa Fluor 488 or Pacific Blue, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), TCR (PerCP-Cy5.5, BD), CD8 (PE-Cy7, BD), IL-17 (Alexa Fluor 488, eBiosciences, Paris, France), IL-21 (PE, eBiosciences), IFN- $\gamma$  (Alexa Fluor 700, BD), IL-4 (APC, BD). Briefly, cells were stimulated for 4 h with phorbol myristate acetate (PMA, 25 ng/ml, Sigma, St. Louis, MO) and ionomycin (10  $\mu$ g/ml, Sigma) in the presence of Brefeldin A (10  $\mu$ g/ml, BD). The cells were then washed in phosphate-buffered saline (PBS) with 0.5% bovine serum albumin, incubated with eBioscience fixation/permeabilization buffers according to the manufacturer’s protocol, and stained with fluorescent antibodies.

Proportions of apoptotic cells in thymic cell populations of 2- to 3-week-old female mice were analysed by flow cytometry using the FITC Annexin-V apoptosis detection kit 1 (BD). The proportions of apoptotic cells (Annexin-V<sup>+</sup>, propidium iodide-negative) were calculated amongst the different T-cell populations selected on their CD4 and CD8 surface expression. Analyses were performed with the FlowJo software package and statistical analyses employed the Mann-Whitney test.

Thymic CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (2 x 10<sup>5</sup>/each) were isolated by labelling with anti-mouse CD4 (Pacific Blue, BD) and CD8 antibodies (PE-Cy7, BD), followed by cell sorting with a BD FACS Aria III.

*RNA extraction, reverse transcription (RT), quantitative PCR and chromatin immunoprecipitation (ChIP)* were all done as previously described (8).

## Results

### ***Arntl2* controls CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T-cell numbers in the spleen and thymus**

We previously described that the presence of C3H alleles at the *Idd6.3* locus increases the number of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells in the spleen and thymus of NOD.C3H congenic mice (8). Our analysis revealed that C3H/HeJ mice and C57BL/6 mice produce significantly lower percentages of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells compared to NOD/Lt mice in the spleen and thymus (Figures 1A, 2A). These differences in CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells are genetically linked to the *Idd6* locus, as shown by the NOD.C3H 6.VIII (6.VIII) strain and by the newly generated *Idd6* NOD.B6 (N.B6) congenic strain. Further analysis of *Idd6* NOD.C3H congenic mice showed that the phenotype is exclusively linked to *Idd6.3* (strain 6.VIIIc) whilst the loci *Idd6.1* (strain 6.VIIIa) and *Idd6.2* (strain 6.VIIIb) are not implicated (Figure 1A, 2A, supplementary data).

To address whether *Arntl2* is sufficient to control the number of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells, we tested our newly created knockout strains. Using the *Idd6* NOD.B6 congenic strains, we found that *Arntl2* mutation leads to an increase in CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells. Again, differences were found in both spleen and thymus. The frameshift *Arntl2* mutation in the NOD mouse had however no effect on the number of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells (Figures 1A, 2A).

These differences in IL-21-producing cells were already found in thymic CD4<sup>+</sup> T cells, but we detected no differences in thymic CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-cell populations, for which we observed less than 0.1% of IL-21<sup>+</sup> T cells for all strains.

We further observed that these differences in IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells correlated well with differences in CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> T cells (Figures 1B, 2B) but not with the proportions of

CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>INF- $\gamma$ <sup>+</sup> T cells in spleen and thymus (Figures 1C,D, 2C,D), consistent with the notion that amongst CD4<sup>+</sup> T cells the Th17 subset is the main source of IL-21.

These results confirm that *Arntl2* is sufficient for controlling the production of CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells. We confirmed by ChIP that the B6 alleles of *Arntl2* give rise to proteins that can bind to the RNA polymerase II binding site of the *Il-21* promoter, and that mutation of the B6 allele abolished the binding. No binding was detected for NOD *Arntl2* alleles compared to C3H (8) and B6 (Figure 3B) alleles. As previously reported, we did not detect any binding of the ARNTL2 partners ARNTL1 or CLOCK at this site of interaction (Figure 3C,D).

### ***Arntl2* controls thymocyte apoptosis**

Previous studies on NOD.B6 congenic strains had shown that the locus *Idd6* is involved in the control of thymocyte apoptosis and proliferation (2; 5; 6). Our results confirm these findings for C57BL/6 mice and show that also C3H/HeJ mice exhibit higher numbers of apoptotic T cells in the thymus compared to NOD/Lt mice. Further analysis of our NOD.C3H congenic mice showed that C3H alleles at *Idd6* and *Idd6.3* increase apoptosis. The effect on apoptosis in these strains was found for CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 4A,B,C).

Mutation of *Arntl2* in NOD.B6 congenic mice decreased apoptosis compared to the control congenic strain. In contrast to what was observed in the NOD.C3H congenic strains 6.VIIIa and 6.VIIIc, the effect was mostly found in CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, much less in CD4<sup>+</sup> T cells and not significantly in CD8<sup>+</sup> T cells. The frameshift mutation of *Arntl2* in NOD mice did not have any influence on apoptosis.

We found no significant changes in the number of double-negative (DN) CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (4.1 $\pm$ 1.1% vs. 6.0 $\pm$ 1.3%), double-positive (DP) CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (68.4 $\pm$ 2.4% vs. 74.4 $\pm$ 3.3%),

single-positive CD4<sup>+</sup> (14.4±1.0% vs. 20.8±2.7%) and CD8<sup>+</sup> (5.1±0.4% vs. 7.1±0.6%) cell populations in the strains.

These results indicate that *Arntl2* is directly involved in the control of thymocyte apoptosis and suggest that C3H alleles and B6 alleles at *Idd6.3/Arntl2* increase thymocyte apoptosis compared to NOD alleles.

### ***Il-21 expression and thymocyte apoptosis correlate at the DP thymocyte stage***

We observed that strains with higher percentages of IL-21-producing CD4<sup>+</sup> T cells also showed less apoptotic cells in the thymus, suggesting a strong correlation between these phenotypes. The thymocyte apoptosis phenotype appears in DP cells before the differences in CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> T cells become detectable. This finding would make it rather unlikely that the increased IL-21<sup>+</sup> T-cell numbers are responsible for increased apoptosis. We therefore tested for *Il-21* expression levels at different thymocyte differentiation stages. Surprisingly, the highest levels of *Arntl2* and *Il-21* expression are found in DP CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 5A,B). Clearly, high levels of *Arntl2* in strain 6.VIIIc correlate with low expression of *Il-21*. This result indicates that the *Il-21* phenotype and the phenotype of thymocyte apoptosis are closely linked. The result also shows that transcriptional changes in *Il-21* appear before the changes in cell numbers (Figure 5B). Interestingly, *Il-17* transcript levels were not affected (Figure 5C).

### ***Arntl2 controls the diabetogenic activity of splenocytes***

We next addressed whether *Arntl2* influences diabetes development. The previous results on NOD.C3H congenic strains suggested that spontaneous diabetes incidence is controlled by

*Idd6*, but that the diabetogenic activity of splenocytes is specifically controlled by the *Idd6.3* subinterval (7; 23). In agreement with previous data, our analyses showed that B6 alleles at *Idd6* result in slight but significant protection from spontaneous diabetes compared to NOD alleles (Figure 6A). Mutation of *Arntl2* had no effect on the incidence of the NOD.B6 congenic strain (Figure 6A). Also, the mutation of the NOD allele of *Arntl2* did not significantly affect diabetes incidence compared to NOD control mice generated in the same experiment. At 30 weeks of age, the incidence was 74% (n=23 females) for control and 57% (n=21 females) for female mice carrying the frameshift mutation, respectively. Taken together the data suggest that neither *Idd6.3* nor *Arntl2* alone affect spontaneous diabetes incidence in the congenic strains.

In diabetes transfer assays, we found that mutation of *Arntl2* in the NOD.B6 congenic mice had very strong effects. The NOD.B6 splenocytes did not transfer diabetes within 12 weeks after transfer (n=15). Deletion of the gene increased significantly the diabetogenic activity of splenocytes (60% at 12 weeks, n=15) and led to results similar to those observed for NOD donors (Figure 6B). Mutation of the NOD allele (n=5 for both groups, 80% diabetic at 12 weeks) did not affect the diabetes transfer efficiency.

Taken together, these results show that *Arntl2* is controlling the diabetogenic activity of splenocytes in *Idd6* NOD.B6 congenic mice.

## Discussion

### *Genetic control of diabetes by Idd6*

*Idd6* has been identified as a NOD susceptibility locus in several independent studies. Bergmann et al. (2) already reported protective effects for B6 alleles at *Idd6* in a larger 8 cM interval excluding the NK locus (3), and Duarte et al. excluded the distal 3 cM interval (D6Mit15 to D6Mit304) from the candidate region (24). Our results suggest that B6 alleles at the D6Mit14 to D6Mit304 interval confer diabetes protection in the NOD mouse. Taken together, these data suggested that spontaneous diabetes incidence is decreased when B6 alleles are present at the D6Mit14 to D6Mit15 interval, corresponding to the *Idd6.2* locus defined by the NOD.C3H congenics (7). The results also suggest that protection in NOD.B6 congenic strains is not conferred by *Idd6.1* and *Idd6.3*. Interestingly, the B6-mediated protection in the *Idd6* NOD.B6 strains appears somehow less important when compared to the previous results for the *Idd6* NOD.C3H strains (4; 18). This discrepancy may be explained by allelic differences or simply the fact that the studies were not performed in parallel or under the same environmental conditions.

Mutation of *Arntl2* alone is clearly not sufficient to alter the spontaneous diabetes incidence in the *Idd6* NOD.B6 congenic strain. There could be several reasons why neither *Idd6.3* nor *Arntl2* are sufficient to alter spontaneous diabetes incidence. One lies obviously in the genetic complexity of the region, the other may be partly due to the age-specific action of *Arntl2* related phenotypes (8).

However and as already observed for the *Idd6.3* locus in the NOD.C3H strains, *Arntl2* strongly controls diabetes transfer using the NOD.B6 mice as donors. The here described altered NOD allele had no effect on diabetes transfer. It would however require generation of

many different alleles and expression levels to definitively argue that the NOD *Arntl2* allele has become ineffective in the mouse, at least for its role in the immune system.

### *Thymocyte apoptosis*

The NOD mouse displays defects in the selection of T lymphocytes in the thymus. NOD genetic variation influences for example the  $\alpha\beta/\gamma\delta$  lineage decision promoted by early expression of transgenic  $\alpha\beta$  TCRs at the DN stage (25). The NOD mouse also displays defects in the mechanism(s) mediating programmed cell death in T lymphocytes (26; 27). Defects in thymic negative selection are thought to result in failure to delete  $\beta$ -cell-reactive T cells, thus contributing to T1D development (28), and autoreactive diabetogenic T cells are likely to result from an inappropriate selection of DP thymocytes in NOD mice.

Previous genetic analyses have mapped T-cell proliferative effects and induced apoptosis to *Idd6* and more precisely to the *Idd6.1-Idd6.3* interval (2; 5; 6; 24). Our present study localises apoptosis effects in SP and DP T cells to *Idd6* and *Idd6.3*. Both B6 and C3H alleles at *Idd6* increase the number of apoptotic cells compared to NOD alleles. The *Arntl2*<sup>-/-</sup> NOD.B6 mice confirm the result for DP T and SP CD4<sup>+</sup> T cells but not for CD8<sup>+</sup> T cells. The differences in affected cell populations could be due to the different alleles or due to other genes present in the *Idd6.3* interval, but this does not alter the conclusion that *Arntl2* is a strong candidate in orchestrating the selection of DP cells.

### *Arntl2 and Il-21 expression in thymocytes*

We previously suggested and hereby confirm that *Arntl2* controls *Il-21* expression (8). NOD alleles and mutation of the B6 alleles of *Arntl2* increase the level of *Il-21* and the number of IL-21-producing cells in the thymus and spleen. Our present study shows also that differences



in *Il-21* expression are particularly related to the differences in *Arntl2* expression in DP thymocytes.

At this stage, there are no differences detectable in the number of IL-21 producing cells. However, apoptosis effects are already detectable in DP cells. It has been shown that IL-21 inhibits thymocyte apoptosis (19). This suggests that the changes in *Il-21* expression may be related to the apoptosis. They could also be responsible for the increased numbers of Th17 cells amongst CD4<sup>+</sup> T cells since their differentiation is induced by IL-21(20; 29; 30).

This rather simplified model is likely to hold with our present knowledge on the role of IL-21, but some points remain to be clarified. One concerns the role of *Arntl2* in other immune cells, in particular in antigen-presenting cells, although previous studies on NOD/scid congenics support the idea of *Arntl2/Idd6.3* having strong T-cell-intrinsic effects (23). Another unsolved issue is the influence of *Arntl2* on other genes that could have effects on apoptosis or lineage commitment.

### *Conclusion and Perspectives*

Our work shows that the circadian rhythm-related gene *Arntl2* links control of *Il-21* expression, thymocyte selection and increased diabetogenic activity in the NOD mouse model of T1D.

### **Acknowledgements**

Author contributions are as follows: B.L. researched data and wrote the manuscript, F.L.-V. designed experiments and researched data, P.A. designed experiments, U.C.R. designed experiments, researched data and wrote the manuscript. U.C. Rogner is the guarantor of this study. There are no conflicts of interest. We thank Pierre-Henri Commere, Corinne Veron,

Gaelle Chauveau-Le Friec and Abokouo Zago for technical assistance, Roberto Malone at the Institut Cochin, Paris, for correcting the manuscript, and Christian Boitard for discussions. The authors acknowledge financial support of their work by Laboratoire d'Excellence Revive (Investissement d'Avenir; ANR-10-LABX-73), EFSD/JDRF/Novo Nordisk Programme, CORDDIM and by recurrent funding from the CNRS, INSERM and Institut Pasteur.

## References

1. Smink LJ, Helton EM, Healy BC, Cavnor CC, Lam AC, Flamez D, Burren OS, Wang Y, Dolman GE, Burdick DB, Everett VH, Glusman G, Laneri D, Rowen L, Schuilenburg H, Walker NM, Mychaleckyj J, Wicker LS, Eizirik DL, Todd JA, Goodman N: T1DBase, a community web-based resource for type 1 diabetes research. *Nucleic Acids Res* 2005;33:D544-549
2. Bergman ML, Duarte N, Campino S, Lundholm M, Motta V, Lejon K, Penha-Goncalves C, Holmberg D: Diabetes protection and restoration of thymocyte apoptosis in NOD Idd6 congenic strains. *Diabetes* 2003;52:1677-1682
3. Carnaud C, Gombert J, Donnars O, Garchon H, Herbelin A: Protection against diabetes and improved NK/NKT cell performance in NOD.NK1.1 mice congenic at the NK complex. *J Immunol* 2001;166:2404-2411
4. Rogner UC, Boitard C, Morin J, Melanitou E, Avner P: Three loci on mouse chromosome 6 influence onset and final incidence of type I diabetes in NOD.C3H congenic strains. *Genomics* 2001;74:163-171
5. Bergman ML, Penha-Goncalves C, Lejon K, Holmberg D: Low rate of proliferation in immature thymocytes of the non-obese diabetic mouse maps to the Idd6 diabetes susceptibility region. *Diabetologia* 2001;44:1054-1061
6. Penha-Goncalves C, Leijon K, Persson L, Holmberg D: Type 1 diabetes and the control of dexamethazone-induced apoptosis in mice maps to the same region on chromosome 6. *Genomics* 1995;28:398-404
7. Hung MS, Avner P, Rogner UC: Identification of the transcription factor ARNTL2 as a candidate gene for the type 1 diabetes locus Idd6. *Hum Mol Genet* 2006;15:2732-2742

8. Lebailly B, He C, Rogner UC: Linking the circadian rhythm gene *Arntl2* to interleukin 21 expression in type 1 diabetes. *Diabetes* 2014;
9. Zeng R, Spolski R, Casas E, Zhu W, Levy DE, Leonard WJ: The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. *Blood* 2007;109:4135-4142
10. Spolski R, Kashyap M, Robinson C, Yu Z, Leonard WJ: IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:14028-14033
11. Spolski R, Leonard WJ: Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nature reviews Drug discovery* 2014;13:379-395
12. Ozaki K, Spolski R, Ettinger R, Kim HP, Wang G, Qi CF, Hwu P, Shaffer DJ, Akilesh S, Roopenian DC, Morse HC, 3rd, Lipsky PE, Leonard WJ: Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6. *J Immunol* 2004;173:5361-5371
13. Frederiksen KS, Lundsgaard D, Freeman JA, Hughes SD, Holm TL, Skrumsager BK, Petri A, Hansen LT, McArthur GA, Davis ID, Skak K: IL-21 induces in vivo immune activation of NK cells and CD8(+) T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 2008;57:1439-1449
14. McGuire HM, Walters S, Vogelzang A, Lee CM, Webster KE, Sprent J, Christ D, Grey S, King C: Interleukin-21 is critically required in autoimmune and allogeneic responses to islet tissue in murine models. *Diabetes* 2011;60:867-875
15. Ostiguy V, Allard EL, Marquis M, Leignadier J, Labrecque N: IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade. *J Leukoc Biol* 2007;82:645-656

16. Monteleone G, Pallone F, MacDonald TT: Interleukin-21: a critical regulator of the balance between effector and regulatory T-cell responses. *Trends in immunology* 2008;29:290-294
17. Peluso I, Fantini MC, Fina D, Caruso R, Boirivant M, MacDonald TT, Pallone F, Monteleone G: IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 2007;178:732-739
18. Rogner UC, Lepault F, Gagnerault MC, Vallois D, Morin J, Avner P, Boitard C: The Diabetes Type 1 Locus Idd6 Modulates Activity of CD4+CD25+ Regulatory T-Cells. *Diabetes* 2006;55:186-192
19. Rafei M, Rouette A, Brochu S, Vanegas JR, Perreault C: Differential effects of gammac cytokines on postselection differentiation of CD8 thymocytes. *Blood* 2013;121:107-117
20. Sofi MH, Liu Z, Zhu L, Yu Q, Kaplan MH, Chang CH: Regulation of IL-17 expression by the developmental pathway of CD4 T cells in the thymus. *Molecular immunology* 2010;47:1262-1268
21. McGuire HM, Vogelzang A, Hill N, Flodstrom-Tullberg M, Sprent J, King C: Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:19438-19443
22. Sutherland AP, Van Belle T, Wurster AL, Suto A, Michaud M, Zhang D, Grusby MJ, von Herrath M: Interleukin-21 is required for the development of type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2009;58:1144-1155
23. Lebailly B, He C, Rogner UC: Linking the circadian rhythm gene *arntl2* to interleukin 21 expression in type 1 diabetes. *Diabetes* 2014;63:2148-2157
24. Duarte N, Lundholm M, Holmberg D: The Idd6.2 diabetes susceptibility region controls defective expression of the *Lrmp* gene in nonobese diabetic (NOD) mice. *Immunogenetics* 2007;59:407-416

25. Mingueneau M, Jiang W, Feuerer M, Mathis D, Benoist C: Thymic negative selection is functional in NOD mice. *J Exp Med* 2012;209:623-637
26. Leijon K, Hammarstrom B, Holmberg D: Non-obese diabetic (NOD) mice display enhanced immune responses and prolonged survival of lymphoid cells. *Int Immunol* 1994;6:339-345
27. Guler ML, Ligons DL, Wang Y, Bianco M, Broman KW, Rose NR: Two autoimmune diabetes loci influencing T cell apoptosis control susceptibility to experimental autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2005;174:2167-2173.
28. Kwon H, Jun HS, Yang Y, Mora C, Mariathasan S, Ohashi PS, Flavell RA, Yoon JW: Development of autoreactive diabetogenic T cells in the thymus of NOD mice. *J Autoimmun* 2005;24:11-23
29. Deenick EK, Tangye SG: Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* 2007;85:503-505
30. Wei L, Laurence A, Elias KM, O'Shea JJ: IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner. *J Biol Chem* 2007;282:34605-34610

## Figure legends

**Figure 1:** Proportions of different types of immune cells: A) CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, C) CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> and D) CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in the spleen of 5 to 6 weeks old females of the different mouse strains. C3H, 6.VIII, 6.VIIIb: n=9; 6.VIIIa, 6.VIIIc, NOD: n=19; NT28: n=11, B6: n=5; N.B6, N.B6A2<sup>-</sup>: n=15. \*: P<0,001 for C3H, 6.VIII, 6.VIIIc versus 6.VIIIa, 6.VIIIb; N.B6A2<sup>-</sup> versus N.B6, B6. All *P*-values are shown in the supplementary data.

**Figure 2:** Proportions of different types of immune cells: A) CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, C) CD4<sup>+</sup>IL-4<sup>+</sup> and D) CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> in the thymus of 3 weeks old females. n=5, 6.VIII and 6.VIIIb n=4. \*: P<0,001 for C3H, 6.VIII, 6.VIIIc versus 6.VIIIa, 6.VIIIb; N.B6A2<sup>-</sup> versus N.B6, B6. All *P*-values are shown in the supplementary data.

**Figure 3:** ChIP analysis of A) RNA POL II, B) ARNTL2, C) ARNTL1 and D) CLOCK on the *Il-21* promoter and the transcription start of *Arpo* (23) using different mouse strains. Two independent tests (+/-) SE using splenocytes from three 5 weeks old female mice each are shown. The results were calculated and normalised as (Ct of IP/ Ct of input)/ (Ct of control-IP/ Ct of input). \*: P<0,001.

**Figure 4:** Proportions of apoptotic cells amongst: A) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, and C) CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> cells in the thymus of the different strains of mice in 3 weeks old females. n=5, 6.VIII and 6.VIIIb: n=4. \*: P<0,001 for C3H, 6.VIII, 6.VIIIc versus 6.VIIIa, 6.VIIIb; N.B6A2<sup>-</sup> versus N.B6, B6. All *P*-values are shown in the supplementary data.

**Figure 5:** Variation of expression of: A) *Arntl2*, B) *Il-21* and C) *Il-17* in the different stages of development of the lymphocytes in the thymus of the strains 6.VIIIa and 6.VIIIc. The results are shown as arbitrary units. n=4 using two 2 weeks old female mice each. \*:  $P < 0,001$ .

**Figure 6:** Diabetes incidence A) spontaneously in the NOD (n=50), N.B6A2<sup>-</sup> (n=22) and N.B6 (n=27) strains. *P*-values: NOD versus N.B6A2<sup>-</sup> =0,012; NOD versus N.B6 <0,009; N.B6A2<sup>-</sup> versus N.B6 =0,947. B) Diabetes incidence after transfer to NOD/SCID mice of NOD (n=15), N.B6A2<sup>-</sup> (n=15) and N.B6 (n=15) CD25<sup>-</sup> splenocytes. *P*-values: NOD versus N.B6A2<sup>-</sup> =0,617; NOD versus N.B6 <0,0001; N.B6A2<sup>-</sup> versus N.B6 =0,001.

**Supplementary data:** Tables of *P*-Values for all strains (Annexe)



Figure 1:

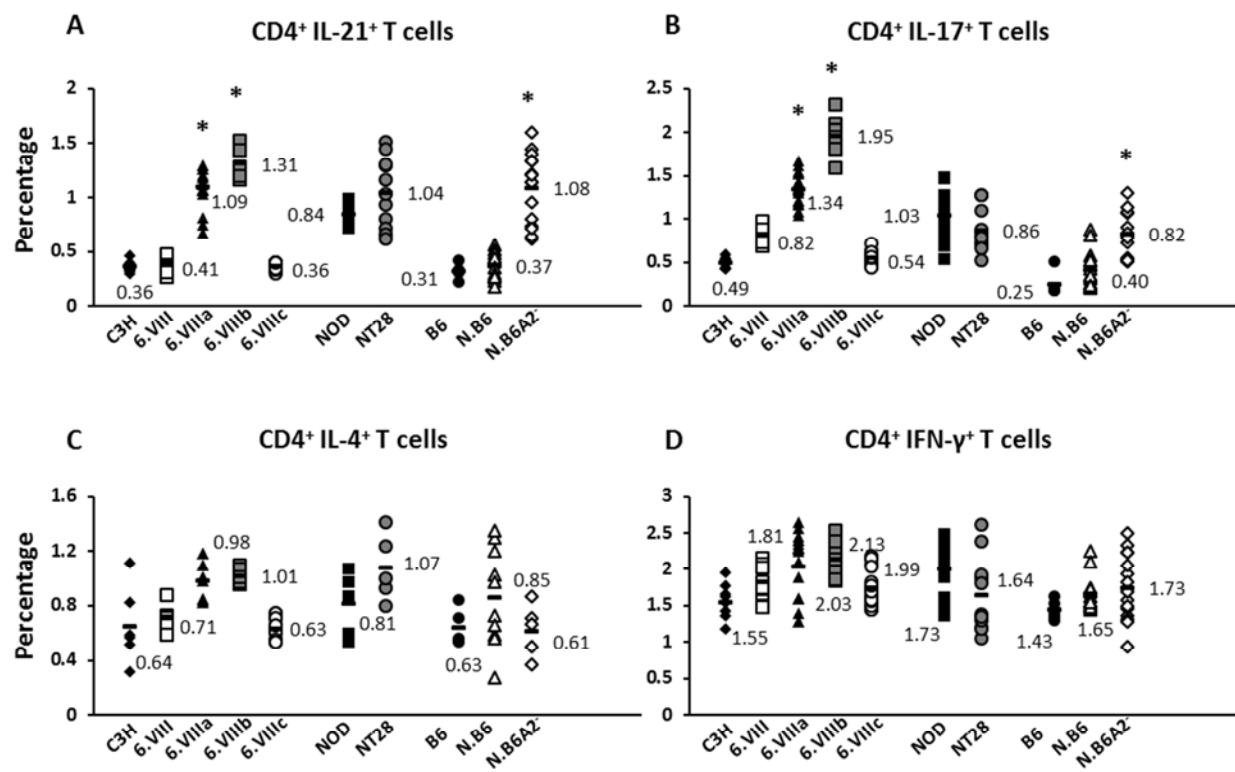


Figure 2:

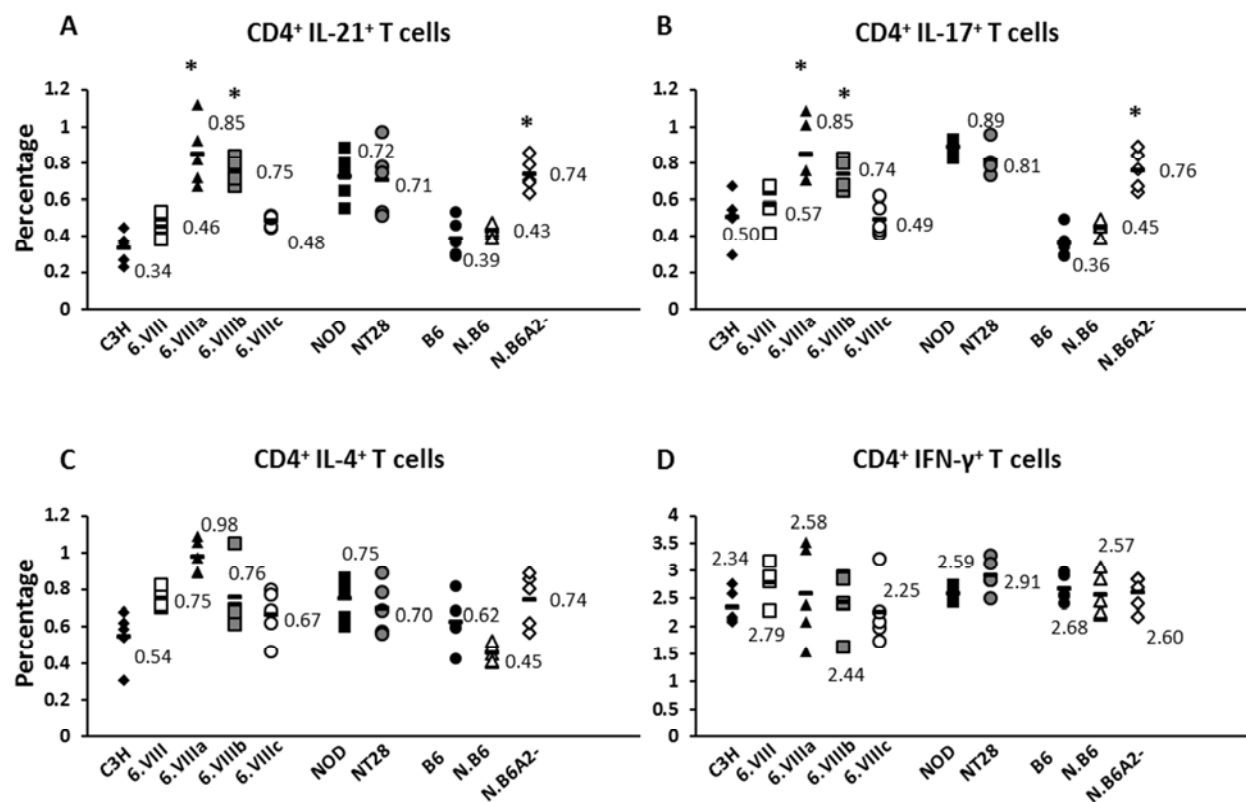


Figure 3:

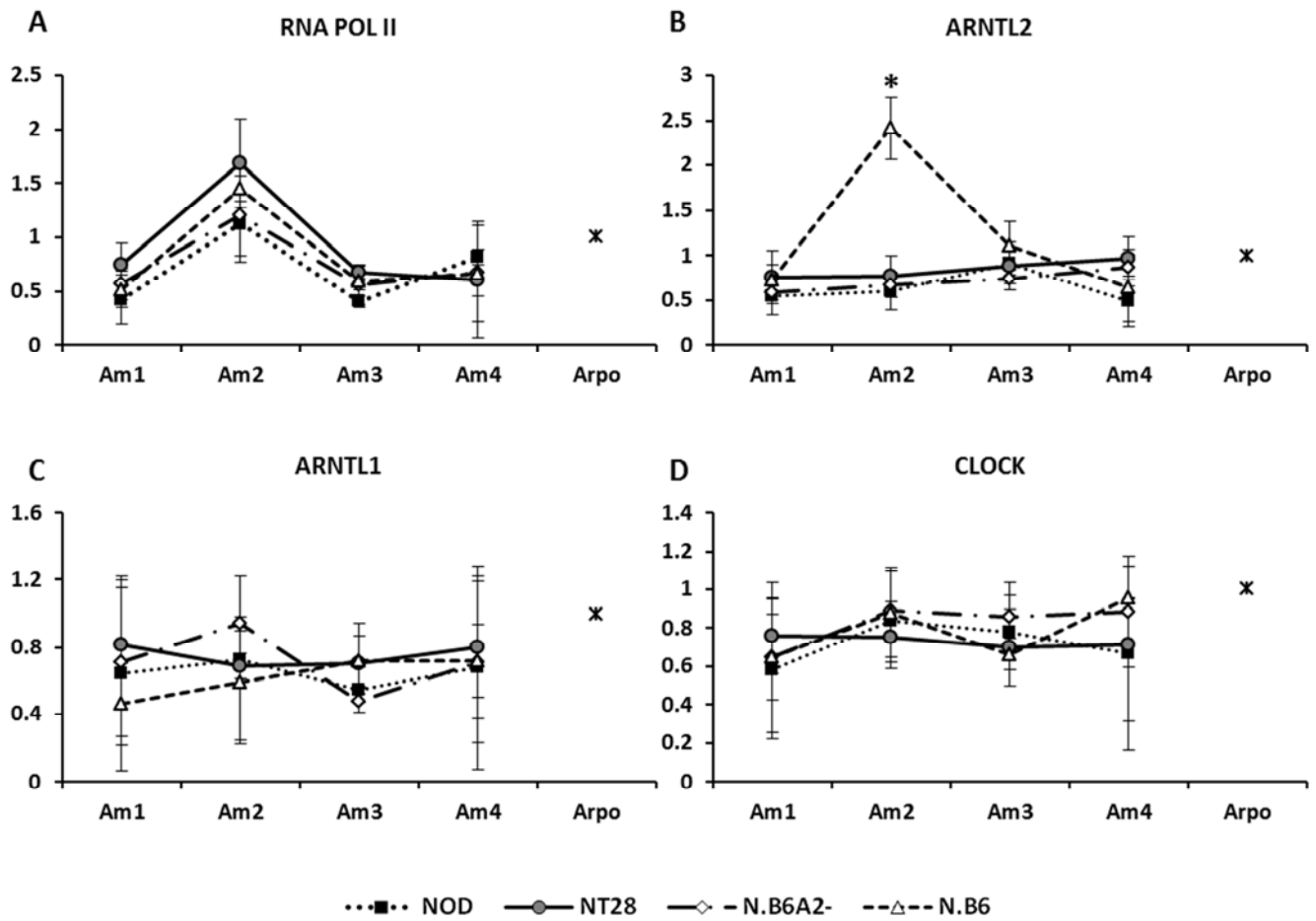


Figure 4:

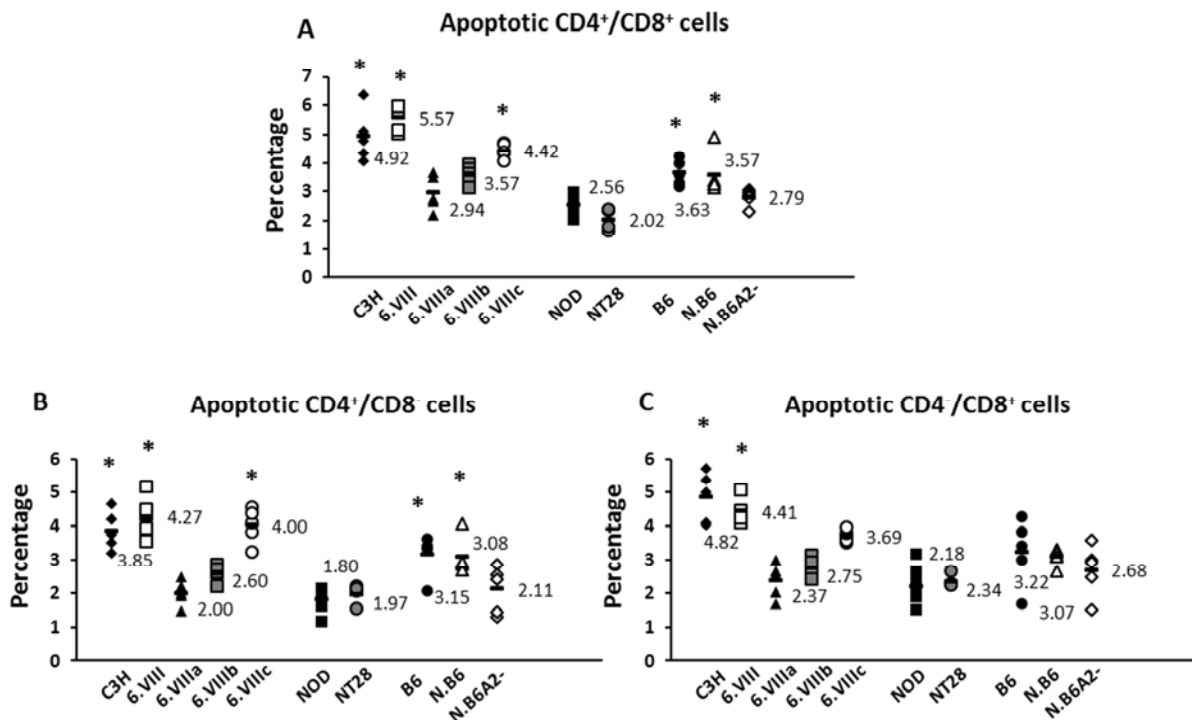


Figure 5:

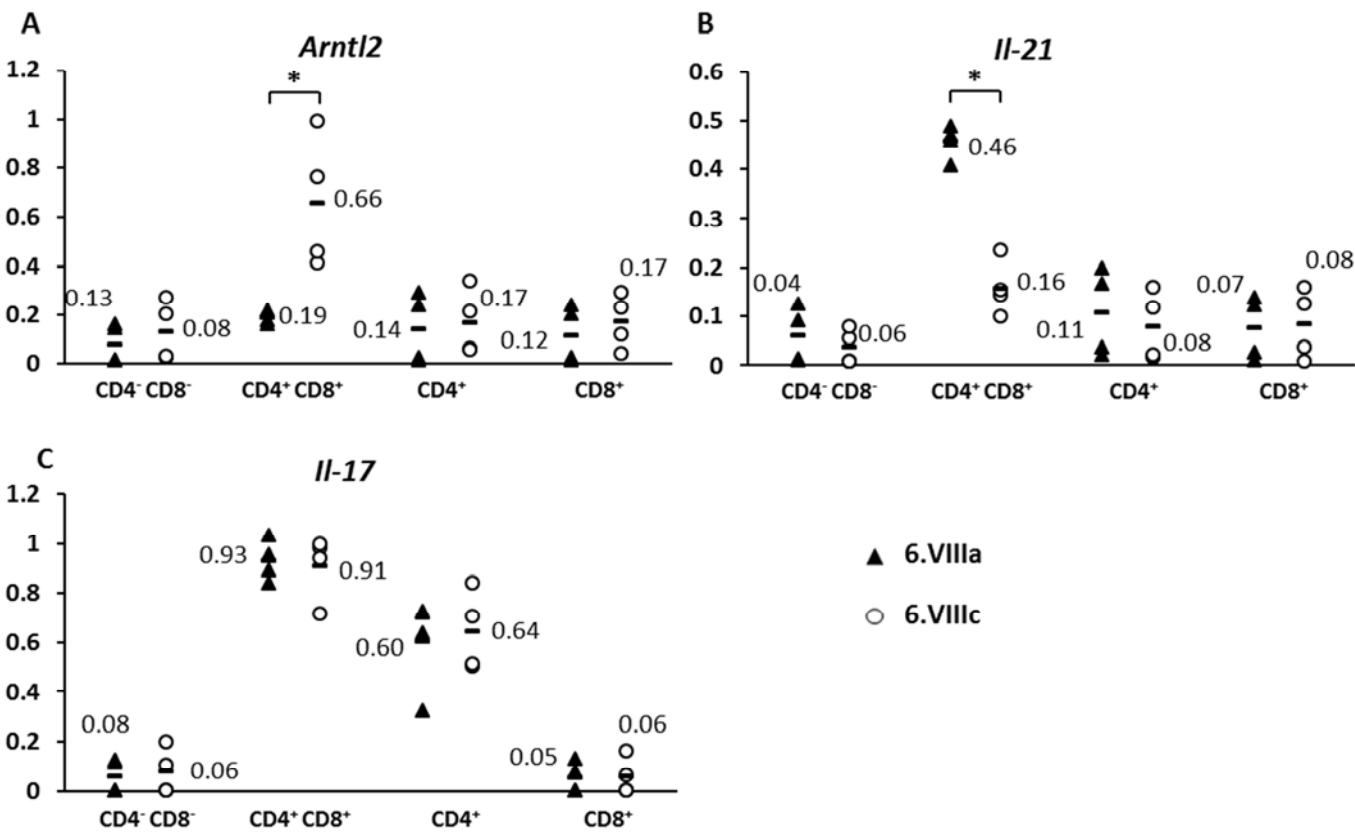
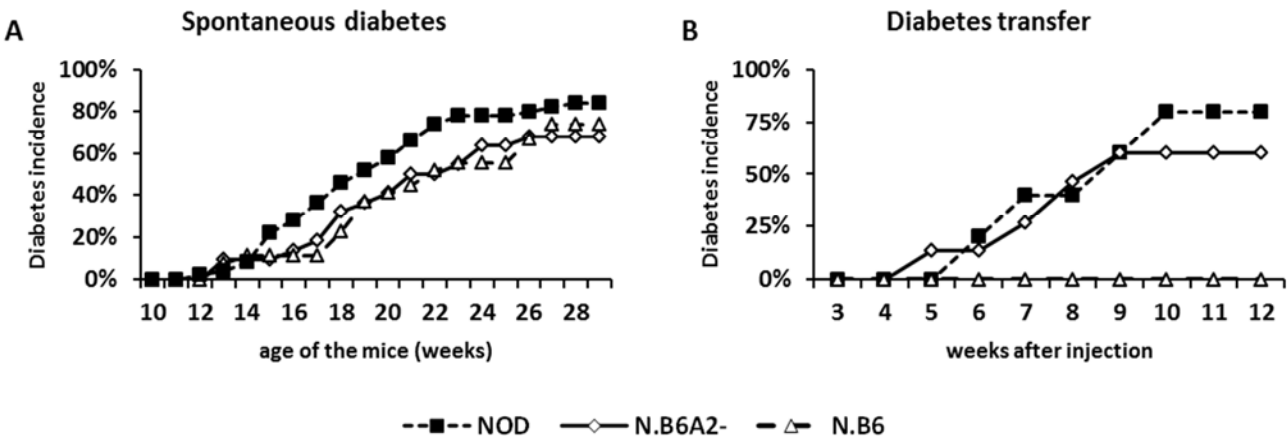


Figure 6:



# **Annexe**

## P-values for the proportions of T cells in spleens of the different mouse strains (Figure 1)

### A) CD4+ IL-21+

IL21	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.825	< 0,0001	0.000409	0.247	< 0,0001	0.000196	0.256	0.72	< 0,0001
6.VIII	0.825	X	< 0,0001	< 0,0001	1	< 0,0001	< 0,0001	0.257	0.952	< 0,0001
6.VIIIa	< 0,0001	< 0,0001	X	0.002	< 0,0001	< 0,0001	0.699	< 0,0001	< 0,0001	0.781
6.VIIIb	0.000409	< 0,0001	0.002	X	< 0,0001	< 0,0001	0.129	0.001	< 0,0001	0.107
6.VIIIc	0.247	1	< 0,0001	< 0,0001	X	< 0,0001	< 0,0001	0.102	0.532	< 0,0001
NOD	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	X	0.155	0.001	< 0,0001	0.056
NT28	0.000196	< 0,0001	0.699	0.129	< 0,0001	0.155	X	0.000458	< 0,0001	0.755
B6	0.256	0.257	< 0,0001	0.001	0.102	0.001	0.000458	X	0.432	0.000129
N.B6	0.72	0.952	< 0,0001	< 0,0001	0.532	< 0,0001	< 0,0001	0.432	X	< 0,0001
N.B6A2-	< 0,0001	< 0,0001	0.781	0.107	< 0,0001	0.056	0.755	0.000129	< 0,0001	X

### B) CD4+ IL-17+

IL17	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0.085	< 0,0001	0.001	0.016	0.095	0.001
6.VIII	< 0,0001	X	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0.105	0.879	0.001	0.001	0.952
6.VIIIa	< 0,0001	< 0,0001	X	< 0,0001	< 0,0001	0.003	0.000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
6.VIIIb	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	X	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0.001	< 0,0001	< 0,0001
6.VIIIc	0.085	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	X	< 0,0001	< 0,0001	0.004	0.01	0.001
NOD	< 0,0001	0.105	0.003	< 0,0001	< 0,0001	X	0.168	< 0,0001	< 0,0001	0.077
NT28	0.001	0.879	0.000152	< 0,0001	< 0,0001	0.168	X	0.000	0.001	0.795
B6	0.016	0.001	< 0,0001	0.001	0.004	< 0,0001	0.000458	X	0.018	0.000
N.B6	0.095	0.001	< 0,0001	< 0,0001	0.01	< 0,0001	0.001	0.018	X	0.000262
N.B6A2-	0.001	0.952	< 0,0001	< 0,0001	0.001	0.077	0.795	0.000129	0.000262	X

### C) CD4+ IL-4+

IL4	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.298	0.028	0.083	0.743	0.23	0.055	0.927	0.255	1
6.VIII	0.298	X	0.003	0.004	0.16	0.471	0.014	0.235	0.625	0.315
6.VIIIa	0.028	0.003	X	0.562	< 0,0001	0.19	0.562	0.007	0.448	0.007
6.VIIIb	0.083	0.004	0.562	X	0.000	0.055	1	0.008	0.501	0.008
6.VIIIc	0.743	0.16	< 0,0001	0.000323	X	0.111	0.000	0.712	0.156	0.792
NOD	0.23	0.471	0.19	0.055	0.111	X	0.171	0.171	0.786	0.171
NT28	0.055	0.014	0.562	1	0.000323	0.171	X	0.022	0.298	0.022
B6	0.927	0.235	0.007	0.008	0.712	0.171	0.022	X	0.159	0.835
N.B6	0.255	0.625	0.448	0.501	0.156	0.786	0.298	0.159	X	0.245
N.B6A2-	1	0.315	0.007	0.008	0.792	0.171	0.022	0.835	0.245	X

### D) CD4+ IFN-g+

IFNg	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.027	0.016	0.027	0.094	0.006	0.939	0.286	0.371	0.404
6.VIII	0.027	X	0.14	0.027	0.313	0.219	0.287	0.008	0.065	0.551
6.VIIIa	0.016	0.14	X	0.044	0.021	0.609	0.048	0.028	0.015	0.056
6.VIIIb	0.027	0.027	0.044	X	0.034	0.06	0.044	0.094	0.065	0.015
6.VIIIc	0.094	0.313	0.021	0.034	X	0.034	0.282	0.019	0.367	0.781
NOD	0.006	0.219	0.609	0.06	0.034	X	0.035	0.007	0.011	0.052
NT28	0.939	0.287	0.048	0.044	0.282	0.035	X	0.91	0.5	0.467
B6	0.286	0.008	0.028	0.094	0.019	0.007	0.91	X	0.036	0.222
N.B6	0.371	0.065	0.015	0.065	0.367	0.011	0.5	0.036	X	0.901
N.B6A2-	0.404	0.551	0.056	0.015	0.781	0.052	0.467	0.222	0.901	X

## P-values for the proportions of T cells in thymi of the different mouse strains (Figure 2)

### A) CD4+ IL-21+

IL21	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.037	0.008	0.016	0.022	0.008	0.008	0.403	0.06	0.008
6.VIII	0.037	X	0.016	0.029	0.713	0.016	0.037	0.54	0.713	0.016
6.VIIIa	0.008	0.016	X	0.54	0.008	0.296	0.403	0.008	0.008	0.296
6.VIIIb	0.016	0.029	0.54	X	0.016	0.903	0.713	0.016	0.016	0.713
6.VIIIc	0.022	0.713	0.008	0.016	X	0.008	0.008	0.296	0.06	0.008
NOD	0.008	0.016	0.296	0.903	0.008	X	0.835	0.008	0.008	1
NT28	0.008	0.037	0.403	0.713	0.008	0.835	X	0.037	0.008	0.835
B6	0.403	0.54	0.008	0.016	0.296	0.008	0.037	X	0.531	0.008
N.B6	0.06	0.713	0.008	0.016	0.06	0.008	0.008	0.531	X	0.008
N.B6A2-	0.008	0.016	0.296	0.713	0.008	1	0.835	0.008	0.008	X

### B) CD4+ IL-17+

IL17	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.54	0.008	0.037	0.835	0.008	0.008	0.06	0.144	0.037
6.VIII	0.54	X	0.016	0.112	0.391	0.016	0.016	0.037	0.178	0.111
6.VIIIa	0.008	0.016	X	0.391	0.008	0.531	0.835	0.008	0.008	0.531
6.VIIIb	0.037	0.112	0.391	X	0.016	0.016	0.713	0.016	0.016	0.903
6.VIIIc	0.835	0.391	0.008	0.016	X	0.008	0.008	0.06	1	0.008
NOD	0.008	0.016	0.531	0.016	0.008	X	0.008	0.008	0.008	0.037
NT28	0.008	0.016	0.835	0.713	0.008	0.008	X	0.008	0.008	1
B6	0.06	0.037	0.008	0.016	0.06	0.008	0.008	X	0.095	0.008
N.B6	0.144	0.178	0.008	0.016	1	0.008	0.008	0.095	X	0.008
N.B6A2-	0.037	0.111	0.531	0.903	0.008	0.037	1	0.008	0.008	X

### C) CD4+ IL-4+

IL4	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.016	0.008	0.111	0.144	0.016	0.21	0.403	0.144	0.095
6.VIII	0.016	X	0.016	0.312	0.391	0.111	0.54	0.111	0.016	0.903
6.VIIIa	0.008	0.016	X	0.111	0.008	0.903	0.022	0.008	0.008	0.008
6.VIIIb	0.111	0.312	0.111	X	0.903	1	0.713	0.27	0.016	1
6.VIIIc	0.144	0.391	0.008	0.903	X	0.531	1	0.676	0.037	0.296
NOD	0.016	0.111	0.903	1	0.531	X	0.531	0.144	0.008	1
NT28	0.21	0.54	0.022	0.713	1	0.531	X	0.835	0.008	0.676
B6	0.403	0.111	0.008	0.27	0.676	0.144	0.835	X	0.06	0.296
N.B6	0.144	0.016	0.008	0.016	0.037	0.008	0.008	0.06	X	0.008
N.B6A2-	0.095	0.903	0.008	1	0.296	1	0.676	0.296	0.008	X

### D) CD4+ IFN-g+

IFNg	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.066	1	0.54	0.403	0.903	0.037	0.21	0.21	0.21
6.VIII	0.066	X	0.903	0.47	0.178	1	0.713	0.903	0.391	0.391
6.VIIIa	1	0.903	X	1	0.531	0.713	0.676	0.676	1	0.835
6.VIIIb	0.54	0.47	1	X	0.713	1	0.391	0.391	0.903	0.903
6.VIIIc	0.403	0.178	0.531	0.713	X	0.06	0.095	0.144	0.21	0.21
NOD	0.903	1	0.713	1	0.06	X	0.06	0.835	1	1
NT28	0.037	0.713	0.676	0.391	0.095	0.06	X	0.403	0.21	0.296
B6	0.21	0.903	0.676	0.391	0.144	0.835	0.403	X	0.531	0.531
N.B6	0.21	0.391	1	0.903	0.21	1	0.21	0.531	X	0.835
N.B6A2-	0.21	0.391	0.835	0.903	0.21	1	0.296	0.531	0.835	X

**P-values for the proportions of apoptotic T cells in thymi of the different mouse strains (Figure 4)**

**A) CD4+CD8+**

DP	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.21	0.008	0.008	0.403	0.001	0.016	0.022	0.06	0.008
6.VIII	0.21	X	0.008	0.008	0.008	0.001	0.016	0.008	0.008	0.008
6.VIIIa	0.008	0.008	X	0.144	0.008	0.182	0.066	0.21	0.403	1
6.VIIIb	0.008	0.008	0.144	X	0.008	0.001	0.016	1	0.531	0.008
6.VIIIc	0.403	0.008	0.008	0.008	X	0.001	0.016	0.022	0.144	0.008
NOD	0.001	0.001	0.182	0.001	0.001	X	0.037	0.008	0.001	0.142
NT28	0.016	0.016	0.066	0.016	0.016	0.037	X	0.016	0.016	0.066
B6	0.022	0.008	0.21	1	0.022	0.008	0.016	X	0.676	0.008
N.B6	0.06	0.008	0.403	0.531	0.144	0.001	0.016	0.676	X	0.008
N.B6A2-	0.008	0.008	1	0.008	0.008	0.142	0.066	0.008	0.008	X

**B) CD4+CD8-**

CD4+	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.296	0.008	0.008	0.676	0.001	0.016	0.144	0.06	0.008
6.VIII	0.296	X	0.008	0.008	0.676	0.001	0.016	0.022	0.037	0.008
6.VIIIa	0.008	0.008	X	0.022	0.008	0.424	1	0.037	0.008	0.835
6.VIIIb	0.008	0.008	0.022	X	0.008	0.001	0.016	0.144	0.06	0.296
6.VIIIc	0.676	0.676	0.008	0.008	X	0.001	0.016	0.095	0.037	0.008
NOD	0.001	0.001	0.424	0.001	0.001	X	0.316	0.008	0.001	0.424
NT28	0.016	0.016	1	0.016	0.016	0.316	X	0.066	0.016	0.713
B6	0.144	0.022	0.037	0.144	0.095	0.008	0.066	X	0.531	0.06
N.B6	0.06	0.037	0.008	0.06	0.037	0.001	0.016	0.531	X	0.037
N.B6A2-	0.008	0.008	0.835	0.296	0.008	0.424	0.713	0.06	0.037	X

**C) CD4-CD8+**

CD8+	C3H	6.VIII	6.VIIIa	6.VIIIb	6.VIIIc	NOD	NT28	B6	N.B6	N.B6A2-
C3H	X	0.676	0.008	0.008	0.008	0.001	0.016	0.037	0.008	0.008
6.VIII	0.676	X	0.008	0.008	0.008	0.001	0.016	0.037	0.008	0.008
6.VIIIa	0.008	0.008	X	0.144	0.008	0.505	1	0.144	0.022	0.531
6.VIIIb	0.008	0.008	0.144	X	0.095	0.023	0.037	0.403	0.403	1
6.VIIIc	0.008	0.008	0.008	0.095	X	0.001	0.016	0.531	0.008	0.022
NOD	0.001	0.001	0.505	0.023	0.001	X	0.316	0.083	0.011	0.23
NT28	0.016	0.016	1	0.037	0.016	0.316	X	0.178	0.016	0.27
B6	0.037	0.037	0.144	0.403	0.531	0.083	0.178	X	0.531	0.296
N.B6	0.008	0.008	0.022	0.403	0.008	0.011	0.016	0.531	X	0.296
N.B6A2-	0.008	0.008	0.531	1	0.022	0.23	0.27	0.296	0.296	X

## **Discussion**



## 1. Arntl2 diminue l'aspect diabétogène des lymphocytes

Le locus *Idd6* sur lequel notre laboratoire se concentre est l'un de la quarantaine de loci génétiques du diabète de type 1 identifiés chez la souris NOD. Une lignée congénique de souris appelée NOD.C3H 6.VIII porteuse des allèles C3H sur cette région candidate dans un fond génétique NOD, développée par notre équipe, a permis de mieux comprendre son mécanisme, en effet, elle présente une résistance au diabète spontané malgré un fond génétique NOD. Cette protection nécessite un système immunitaire intact et peut être transférée par les splénocytes de cette lignée, comme l'ont prouvé les expériences de co-transfert de splénocytes depuis cette lignée vers des souris NOD/SCID [158]. Les effets de cette région *Idd6* semblent être une amplification de la proportion des cellules iNKT CD4<sup>+</sup> [237] ainsi que des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> régulateurs [209] et leur activation [155].

L'analyse plus poussée de cette région a été possible grâce au développement de lignées sous congéniques issues de cette lignée NOD.C3H 6.VIII, en effet, la région *Idd6* forte de 5.8Mb était trop grande pour pouvoir identifier un ou plusieurs gènes candidats. Ces lignées, appelées 6.VIIIa, 6.VIIIb et 6.VIIIc ont permis de diviser cette région en trois sous-intervalles *Idd6.1*, *Idd6.2* et *Idd6.3*. Dans un premier temps, les incidences de diabète de ces lignées ont été testées, ces trois lignées sous-congéniques ont montré des incidences similaires, intermédiaires entre la lignée NOD et la lignée congénique NOD.C3H 6.VIII. Comme des analyses précédentes avaient déjà montré que l'intervalle *Idd6.2* de 2.5Mb contrôlait le nombre et la fonction des iNKT, et que la région *Idd6.3* de 700kb contrôlait l'activité des splénocytes, il semblait clair que cette région dans son ensemble agissait sur les acteurs du système immunitaire, notamment les lymphocytes. C'est pourquoi une analyse de co-transfert de splénocytes a été réalisée, et il est apparu que les splénocytes de la lignée 6.VIIIc apportaient une bien meilleure protection que ceux des lignées 6.VIIIa et 6.VIIIb [158].

Grace à ces résultats, il a été possible de réduire la zone d'intérêt à la seule région *Idd6.3*, suffisamment réduite (700 kb) pour identifier un gène candidat très intéressant, car présentant des polymorphismes et une variation d'expression selon les lignées étudiées : *Arntl2*. Ce gène code pour un facteur de transcription contrôlant le rythme circadien. Il est surexprimé dans la rate et le thymus des lignées de souris C3H, NOD.C3H 6.VIII et 6.VIIIc par rapport aux lignées portant les allèles NOD au locus *Idd6.3*, c'est-à-dire les lignées NOD, 6.VIIIa et 6.VIIIb. De plus, plusieurs polymorphismes et variations d'épissage ont été identifiés en comparant le gène et ses transcrits dans les lignées NOD et C3H [156] [150].

Les effets de ce gène sur le diabète ont ensuite été étudiés, à la fois par sa surexpression et son inhibition. Les tests réalisés dans le but de tester l'effet d'une inhibition d'*Arntl2* par des siRNA anti *Arntl2* dans la lignée congénique NOD.C3H 6.VIII ont montré une augmentation de l'incidence de diabète en plus d'une amplification des cellules T CD4<sup>+</sup> et une diminution des cellules T régulatrices CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> dans le système immunitaire périphérique. D'autres tests ont également montré qu'une surexpression d'*Arntl2* dans les cellules T CD4<sup>+</sup> entraîne une inhibition de la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et de leur activité diabéto-gène. Cela suggère qu'*Arntl2* agisse sur la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et par cela sur l'équilibre entre les fonctions effectrices et régulatrices.

Cet effet est particulièrement intéressant dans le diabète de type 1 car il est depuis longtemps reconnu que les cellules T CD4<sup>+</sup> sont largement impliquées dans la destruction des cellules bêta des îlots de Langerhans lors du développement du diabète chez la souris NOD. De nombreux facteurs entraînant leur trop grande prolifération et activation ont déjà été mis en évidence chez la souris NOD, certains d'entre eux ont d'ailleurs été identifiés dans la région *Idd6* sans avoir pu être totalement compris, *Idd6* étant une des régions du génome connues pour être liée au diabète de type 1, sur laquelle notre laboratoire se concentre.

C'est pourquoi nous avons décidé de tester l'activité diabétogène directe de ces cellules, pour cela nous avons réalisé deux tests en parallèle. Nous avons réalisé un transfert de splénocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> des lignées 6.VIIIa et 6.VIIIc à des souris NOD/SCID et dans le même temps nous avons fait un transfert de ces mêmes types de splénocytes de souris NOD à des souris 6.VIIIa/SCID et 6.VIIIc/SCID et tester les incidences de diabète. Alors que nous n'avons trouvé aucune différence d'incidence de diabète pour les souris 6.VIIIa/SCID et 6.VIIIc/SCID ayant reçu les splénocytes NOD (dans les deux cas le taux de diabète était d'environ 90%), l'incidence des souris NOD/SCID ayant reçu les splénocytes 6.VIIIa était d'environ 80% (similaire à une injection de splénocytes de la lignée NOD) tandis que les souris ayant reçu les splénocytes 6.VIIIc n'avaient une incidence de diabète que de 20%. Cela prouve non seulement que ce sont bien ces cellules immunitaires qui apportent l'effet diabétogène sans que le fond génétique des souris ne puisse compenser leur effet, mais aussi que les splénocytes n'ont pas le même effet diabétogène en fonction de la lignée dont ils sont issus [234].

L'effet protecteur d'*Arntl2* était donc confirmé mais la façon dont il agissait sur l'équilibre immunitaire restait à découvrir, la meilleure piste semblait passer par les cellules T CD4<sup>+</sup>, car non seulement on pouvait observer une augmentation de leur prolifération dans la rate, dans le cas d'une diminution de l'expression d'*Arntl2* induite par RNAi [209], mais le transfert de splénocytes a aussi montré que ces cellules portent la différence de capacité à induire le diabète [234].

## 2. ARNTL2 diminue l'expression d'*Il-21*

L'étape suivante a donc consisté à chercher les effets d'ARNTL2 sur les cellules T CD4<sup>+</sup> et, comme il s'agit d'un facteur de transcription, l'objectif était d'identifier les gènes qu'il régule, et donc présentant une variation d'expression selon la version, NOD ou C3H d'*Arntl2* exprimée. L'équipe a donc analysé par puce l'expression de l'ensemble des gènes présentant une variation d'expression en fonction de l'allèle C3H ou NOD d'*Arntl2* au sein des cellules T CD4<sup>+</sup>. Cette technique ayant été réalisée sur les cellules des lignées sous-congéniques 6.VIIIa et 6.VIIIc, il y avait le risque de trouver d'autres gènes présent sur la région *Idd6.3*, c'est pourquoi seuls les gènes trouvés comme présentant une variation d'expression dans ce test et dans un test comparant une surexpression d'*Arntl2* grâce à un plasmide par rapport à un contrôle ont été retenus. Les gènes montrant une variation stable d'expression dans ces tests et confirmés par RT-QPCR étaient, outre *Arntl2* : *Ribosomal protein L35a (Rpl35a)*; *High mobility group box 1 (Hmgb1)*; *Cytochrome c oxidase subunit VIIc (Cox7c)*; *Gag Protein* et *Interleukin 21*.

Parmi ces gènes se trouvait un candidat potentiel très intéressant : le gène codant pour l'interleukine-21, en raison du fort lien entre cette interleukine et le système immunitaire et également d'autres formes de maladies auto-immunes, nous avons décidé de nous concentrer sur *Il-21*.

C'est à ce moment que je suis arrivé dans le laboratoire, à ce stade nous savions donc qu'*Arntl2* apportait une résistance au diabète et que parmi les gènes qu'il régulait se trouvait l'interleukine-21, mes objectifs étaient donc de :

- Comprendre la relation entre le gène *Arntl2* et l'interleukine-21, leurs interactions, si il s'agit d'une régulation directe ou indirecte, et leur mode d'action.

- Analyser plus en détails les cellules produisant de l'IL-21, leur proportion et leur rôle dans le diabète.
- Comprendre la façon dont ces cellules agissent sur le système immunitaire dans son ensemble, notamment en quoi *Arntl2* les rend moins diabéto-gènes et si cela passe par son effet sur IL-21.
- Chercher si la part circadienne d'*Arntl2* influence l'expression des gènes qu'il contrôle.

Pour commencer, nous avons voulu préciser ce que signifiait la différence d'IL-21 trouvée entre nos lignées, on pouvait en effet se demander si cette variation était due à une plus grande production d'IL-21 par le même nombre de cellules, ou une plus grande proportion de cellules produisant cette cytokine. Cet aspect est très important car même si une plus grande production d'IL-21 influencera l'intégralité du système immunitaire, le fait de trouver plus de cellules la produisant reflète une plus grande modification de l'équilibre entre les cellules effectrices et les régulatrices.

Nous voulions pouvoir travailler directement sur les cellules immunitaires de nos souris, nous avons donc décidé de travailler sur les rates afin de disposer de suffisamment de cellules et de pouvoir caractériser une vue d'ensemble du système immunitaire. Dans un premier temps, nous avons réalisé ces tests sur les lignées congéniques dont nous disposions, les plus intéressantes étant les lignées 6.VIIIa et 6.VIIIc, les deux lignées présentant les plus grandes similitudes et ne différant que par l'origine NOD ou C3H d'*Idd6.3* ce qui permet de se concentrer au maximum sur *Arntl2*. Nous avons complété ces tests en analysant également les autres lignées congéniques ainsi que les lignées d'origine. Par la suite, nous avons disposé d'autres lignées de souris : la lignée N.B6A2<sup>-</sup> particulièrement utile, car cette lignée réalisée sur fond NOD possède un locus *Idd6* B6 avec une inactivation du gène *Arntl2*, qui permet de

se concentrer exclusivement sur les effets de ce gène par comparaison avec sa lignée contrôle : N.B6, la même sans l'inactivation d'*Arntl2*. Nous avons aussi utilisé une autre lignée porteuse d'une inactivation d'*Arntl2* mais cette fois sur un fond B6, la lignée B6A2<sup>-</sup> comparée à la lignée B6 elle-même, afin de vérifier si le gène *Arntl2* possède une action indépendamment du fond génétique NOD. Ainsi qu'une lignée TALEN : NT28, également sur fond génétique NOD qui bénéficie d'une inactivation d'*Arntl2* grâce à la technique TALEN. Cette lignée a notamment été utilisée par comparaison avec la lignée NOD afin de tester si une version totalement inactivée de cette protéine va présenter des modifications de phénotype par rapport à la version NOD dont on ne connaît pas l'efficacité.

Ces lignées, une fois encore, ne montraient pas de différence d'incidence de diabète spontané par rapport à leur contrôle, ce qui montre à nouveau que la suppression d'*Arntl2* à elle seule n'est pas suffisante pour induire un diabète, mais les analyses de transfert de splénocytes ont confirmé la très forte diminution du caractère diabétogène des splénocytes associée à *Arntl2*. En effet on obtient 80% de souris diabétiques après transfert de splénocytes de la lignée N.B6A2<sup>-</sup> tandis qu'aucune souris n'a développé de diabète après transfert de splénocytes N.B6.

Nous avons donc utilisé la technique de la cytométrie en flux, en effet grâce aux marquages et à l'analyse spécifique des cellules individuelles nous pouvions répondre à notre question. Pour cela nous avons mis au point un protocole de marquage utilisant un mélange de facteurs spécifiques à certains types de cellules immunitaires dont nous voulions étudier les proportions entre nos différentes lignées de souris. Dans un premier temps nous voulions confirmer l'effet observé par puces d'expression et RT-QPCR sur la variation d'expression d'IL-21. Nous avons donc utilisé ces marquages spécifiques pour identifier les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> et avons trouvé une différence très nette, d'abord entre les lignées congéniques, ce qui nous a dès lors confirmé l'effet d'*Idd6.3* sur la proportion de ces cellules, mais

également par la suite entre la lignée N.B6A2<sup>-</sup> et son contrôle N.B6 ainsi qu'entre la lignée B6A2<sup>-</sup> et la lignée B6 ce qui confirme l'aspect spécifique d'*Arntl2* sur ce phénotype, et ce de façon générale et pas seulement dans le contexte de la souris NOD.

Dans tous les cas nous nous sommes aperçus que les lignées de souris bénéficiant d'une version fonctionnelle d'ARNTL2 présentaient, par rapport à leurs contrôles respectifs, un taux de cellules T CD4<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> inférieur. Cela vaut pour les lignées C3H, 6.VIII et 6.VIIIc par rapport aux lignées NOD, 6.VIIIa et 6.VIIIb ainsi que pour la lignée N.B6 par rapport à N.B6A2<sup>-</sup> et pour la lignée B6 comparée à B6A2<sup>-</sup>. En revanche on n'a pu observer aucune différence entre les lignées NT28 et NOD.

Cela confirme que l'action d'*Arntl2* ne modifie pas seulement le taux d'expression d'IL-21 dans les cellules produisant spontanément cette cytokine mais bien la proportion de ces cellules, ce qui, dans les mécanismes d'équilibre immunitaire, est très important car cela signifie que la proportion de cellules effectrices est augmentée.

Au fur et à mesure de nos analyses nous nous sommes rendus compte que ces effets variaient en fonction de l'âge des souris ; nous avons voulu étudier ce phénomène, et après une étude menée sur des souris d'âges différents, nous avons découvert que cette différence de proportions de cellules T CD4<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> était présente très tôt, environ vers 2/3 semaines, et disparaissait vers environ 11/12 semaines. Cette diminution du phénotype peut expliquer pourquoi on n'observe pas de différences d'incidence de diabète entre les lignées.

Une fois ces tests effectués, nous avons également voulu vérifier les niveaux d'expression des gènes trouvés comme régulés, ou en tout cas dont l'expression est modifiée par *Arntl2*, de façon circadienne afin de voir si *Arntl2* imposait un rythme à ces gènes. Nous avons découvert que le profil d'expression du gène *Il-21* ressemblait à celui de l'allèle NOD d'*Arntl2* dans la lignée 6.VIIIa mais pas dans la lignée 6.VIIIc portant l'allèle C3H. *Il-21* était

constamment inhibé durant la journée dans la lignée 6.VIIIc par comparaison avec la lignée 6.VIIIa. Cela pourrait s'expliquer par le fait que ces deux gènes soient sous un contrôle commun dans la souris NOD, que ce soit le système régulateur circadien central ou périphérique.

Nous avons également analysé l'expression d'autres gènes circadiens dans ces lignées congéniques au sein des cellules T CD4<sup>+</sup>. Plusieurs d'entre eux montraient des différences d'expression en fonction des heures de la journée. Par exemple à 17h *Per1* est surexprimé dans la lignée 6.VIIIa et *Per2* dans la lignée 6.VIIIc. *Clock* est surexprimé dans la lignée 6.VIIIa à 13h et dans la lignée 6.VIIIc à 17h. Aucun changement dans le rythme circadien n'a été trouvé pour les gènes *Arntl1*, *Arnt*, *Per1*, et *Per2* ce qui laisse à penser qu'il n'y a pas de différence générale dans l'expression des gènes associés au rythme circadien. Cependant, dans le cas du gène *Clock* nous avons trouvé un décalage pour le pic d'expression dans la lignée 6.VIIIc par comparaison à la lignée 6.VIIIa. Cela peut influencer l'expression circadienne d'*Arntl2* puisque CLOCK se lie à la région promotrice du gène *Arntl2*. Il est également intéressant de noter qu'*Arntl1*, *Per1* et *Per2* ont un profil d'expression dans les deux lignées semblable à celui d'*Arntl2* dans la lignée 6.VIIIa. Les changements observés dans le rythme circadien d'*Arntl2* peuvent être dus à l'altération de sa séquence dans la souris 6.VIIIa.

L'étude de transcriptome suggérait qu'ARNTL2 contrôle l'expression du gène *Il-21* et que de hauts niveaux d'ARNTL2 suppriment l'expression d'*Il-21*. Connaissant le rôle de cette cytokine sur le système immunitaire, c'est-à-dire la prolifération des cellules T, et sachant que ces cellules sont un facteur majeur du diabète de type 1, particulièrement chez la souris, les résultats précédents obtenus par surexpression et inhibition d'*Arntl2* deviennent plus clairs. La prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> après une sous-expression d'*Arntl2* pourrait être liée à une



augmentation de la production d'IL-21, tandis que la diminution d'activité diabétogène des splénocytes surexprimant *Arntl2* peut être reliée à la diminution de la production d'IL-21.

Le fait d'identifier cette interleukine comme liée à notre gène d'intérêt a vraiment été un grand pas en avant car cela relie directement ce facteur de transcription à la régulation du système immunitaire. Cela nous a amenés à nous demander si, par l'intermédiaire d'IL-21, *Arntl2* n'entraînait pas plus de changements dans l'ensemble de ces mécanismes et de ces populations cellulaires.

### 3. *Arntl2* agit sur l'équilibre du système immunitaire

C'est pourquoi, pendant les analyses cytométriques visant à confirmer les proportions de cellules T CD4<sup>+</sup> IL-21<sup>+</sup> nous avons également cherché à comparer selon les lignées les proportions d'autres types de cellules immunitaires, que ce soit les principales catégories de lymphocytes T effecteurs, mais aussi les T régulateurs et les cellules B et dendritiques. Dans le cadre de ces tests sur les rates des souris nous avons décidé de travailler sur des souris de 5 à 6 semaines, car nous voulions éviter le biais d'avoir des souris d'âges différents et c'est à cette période que les différences nous paraissaient les plus importantes. Nous avons également fait très attention à effectuer nos tests à des horaires constants pour éviter le biais de l'expression circadienne de certains de nos facteurs d'étude.

Pour savoir quel mix de marquage cellulaire employer nous avons réfléchi aux types de cellules touchées par les modifications de l'équilibre immunitaire, au final nous avons décidé de tester les 3 principaux types de cellules T effectrices, les Th1, Th2 et Th17, produisant spécifiquement respectivement l'interféron gamma, l'IL-4 et l'IL-17 ; ainsi que les cellules T régulatrices produisant spécifiquement FoxP3 afin de voir si ces cellules étaient également touchées, éventuellement par un mécanisme de compensation. Nous en avons aussi profité

pour tester d'autres grands types de cellules immunitaires, les cellules T CD8<sup>+</sup> et les cellules B agissant de manière complémentaire aux cellules T et les cellules dendritiques.

Ces différentes analyses nous ont permis de définir de façon très précise que la présence du gène *Arntl2* fonctionnel entraîne de nombreux changements dans ces populations de cellules par rapport à sa version NOD « non-fonctionnelle » ou son absence.

De façon générale nous avons pu confirmer que l'absence d'*Arntl2* fonctionnelle entraîne une augmentation de la proportion de cellules T CD4<sup>+</sup> comme nous l'avions observé précédemment, mais aussi des cellules T CD8<sup>+</sup>, un autre type de cellules effectrices. Dans le même temps il n'y a aucun changement dans la proportion des cellules régulatrices ce qui confirme la modification de l'équilibre immunitaire car la part effectrice est renforcée sans modification de la part régulatrice. On constate cependant une augmentation de la proportion des cellules dendritiques et des cellules B pour les lignées porteuses de la version fonctionnelle d'ARNTL2, cela est peut-être dû à un mécanisme de compensation ou à une modification de la capacité de spécialisation de ces cellules.

Pour ce qui est des différents types de cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices, de façon très intéressante, alors que la proportion des cellules Th1 n'est pas du tout affectée par *Arntl2*, les Th2 et Th17 sont trouvées en plus grandes quantité en l'absence d'ARNTL2. Ces deux types de cellules étant celles produisant, et étant les plus affectées par IL-21 cela semble tout à fait logique. Ces effets sont donc probablement indirectement dus à la différence d'expression d'IL-21 qui agit comme un facteur d'amplification des cellules T CD4<sup>+</sup> effectrices.

Ces différences très marquées de proportions de cellules et donc de l'équilibre entre les cellules T effectrices et régulatrices explique parfaitement les observations réalisées lors des transferts de splénocytes, en effet, on comprend mieux pourquoi les splénocytes de la lignée 6.VIIIa, donc avec la version non-fonctionnelle d'*Arntl2*, entraînaient une plus grande

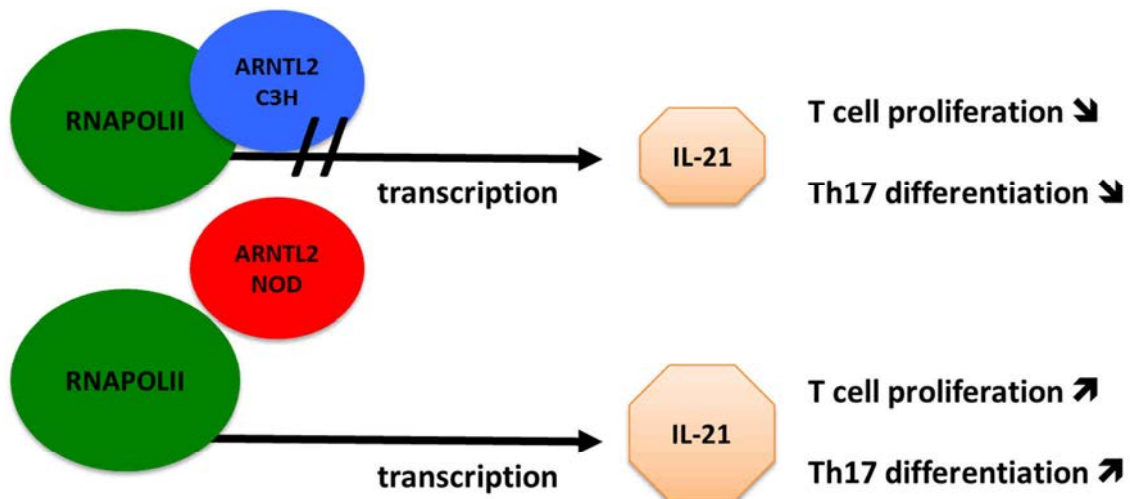
incidence de diabète, cela était sans doute dû aux plus grandes proportions de ces cellules parmi celles transférées et de leur plus grande capacité à faire proliférer les cellules T CD4<sup>+</sup> dans leur ensemble, ce qui augmente les risques de voir ces cellules infiltrer le pancréas et détruire les cellules bêta.

Nous avons donc la confirmation de l'action d'*Arntl2* sur IL-21 et par ce fait sur l'équilibre du système immunitaire par son amplification de la prolifération des cellules effectrices, mais il nous restait à définir comment *Arntl2* agissait sur IL-21.

#### 4. Le contrôle d'*Il-21* par ARNTL2 : une interaction directe

Afin de comprendre de quelle manière ARNTL2 agit sur *Il-21* nous avons voulu tester par ChIP l'appariement éventuel d'ARNTL2 sur le gène *Il-21*. Nous avons tout d'abord confirmé la présence d'une zone de liaison dans la région promotrice du gène par le binding de la RNA polymérase 2 à environ 1000 paires de bases du codon start du gène, zone qui contient des séquences E-Box potentielles. Puis nous avons également prouvé le binding de la protéine ARNTL2 sur ce même site dans les lignées 6.VIIIc et B6 mais pas dans les lignées 6.VIIIa, NOD et N.B6A2<sup>-</sup>. Cela semble signifier que la fixation de cette protéine inhibe l'expression de l'interleukine-21 : la version NOD de la région *Idd6.3* ne permet pas d'avoir une protéine ARNTL2 fonctionnelle, capable de se lier à *Il-21* et donc d'inhiber son expression. Cette liaison d'ARNTL2 apparaît très spécifique car nous avons également testé le binding d'autres facteurs de transcription de la même famille, comme CLOCK et ARNTL1 et n'avons trouvé aucun appariement. Nos contrôles n'indiquent pas que l'anticorps utilisé pour ces tests de ChIP discrimine entre les versions alléliques d'ARNTL2, cependant nous ne pouvons pas exclure la possibilité de l'existence d'une isoforme spécifique NOD qui serait indétectable pour cet anticorps.

ARNTL2 serait donc un répresseur transcriptionnel d'*Il-21*, mais il n'est pas encore tout à fait clair à ce stade si c'est la protéine ARNTL2 elle-même, une éventuelles protéine partenaire ou d'autres mécanismes inconnus qui agissent de cette façon. Ce qui semble sûr c'est que le contrôle d'ARNTL2 se fait directement et non par l'intermédiaire d'un autre facteur (Figure 34).



**Figure 34 :** Modèle de l'action d'ARNTL2 sur *Il-21* en fonction de la version NOD ou C3H de ce facteur de transcription.

##### 5. Rôle d'*Arntl2* dans le développement des lymphocytes T

Nous avons confirmé un effet d'*Arntl2* sur les proportions des cellules effectrices dans la rate, ce qui prouve une modification générale de l'équilibre immunitaire entre les cellules effectrices et régulatrices. Nous avons donc voulu refaire ces mêmes tests dans le thymus de nos souris afin de déterminer si ces différences étaient déjà présentes à un stade plus précoce dans le développement des lymphocytes.

Ces études ont également été réalisées sur toutes les lignées de souris et de façon générale, on trouve les mêmes effets dans le thymus que dans la rate, c'est-à-dire une plus grande proportion de cellules effectrices, particulièrement IL-21<sup>+</sup> et IL-17<sup>+</sup> dans les lignées porteuses

d'une version non-fonctionnelle d'*Arntl2* que dans celles portant une version fonctionnelle. Cette différence de proportions de cellules effectrices étant déjà présente dans le thymus, cela signifie qu'elle se met en place au cours de la spécialisation des lymphocytes qui se produit dans le thymus et non pas au cours de leur maturation, étape intervenant plus tardivement dans le développement de ces cellules. Nous avons donc décidé d'essayer de définir plus spécifiquement ce phénomène de spécialisation en analysant les cellules à un stade de développement moins avancé, les cellules T doubles positives  $CD4^+CD8^+$ , cette caractéristique structural permettant de définir le stade de développement des lymphocytes [41].

Les cytokines nous servant de marqueur n'étant pas présentes à ce stade ainsi qu'au stade précédent double négatif  $CD4^-CD8^-$  nous ne pouvions pas déterminer si cette différence se situait encore plus en amont. Cependant nous avons pensé qu'il était très intéressant de nous concentrer sur l'étape de développement des lymphocytes correspondant à ce stade double positif car c'est à ce moment que les cellules subissent le processus de sélection négative visant à détruire les cellules trop auto-réactives par apoptose, ce qui est une étape très importante dans les processus auto-immuns. Mais en plus nous savions par la bibliographie qu'IL-21 était déjà connue pour inhiber l'apoptose des thymocytes, le changement d'expression d'IL-21 par la variation d'*Arntl2* pourrait donc être relié à l'apoptose [45]. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation de cellules effectrices dans les lignées présentant un manque d'*Arntl2*, notamment les Th17 car leur différenciation est induite par IL-21 [71]. Nous pensions donc que l'apoptose pouvait jouer un rôle dans l'établissement des différences apparaissant entre les lignées de souris, nous avons donc analysé la proportion de cellules en apoptose parmi nos lignées de souris.

## 6. *Arntl2* contrôle l'apoptose des thymocytes

Il est connu que la lignée NOD présente des défauts de sélection des lymphocytes T dans le thymus, notamment dans les mécanismes de mort cellulaire programmée (apoptose) des lymphocytes T [238]. Ces anomalies de sélection négative dans le thymus sont fortement suspectées d'être responsables de l'incapacité d'un organisme à éliminer les cellules T potentiellement auto-réactives contre les cellules bêta du pancréas, ce qui contribuerait fortement au développement du diabète de type 1. De façon générale, les cellules T auto-réactives et diabéto-gènes sont probablement la résultante d'une sélection inappropriée des thymocytes double positifs dans la lignée NOD.

La suite de nos recherches a donc consisté à savoir si le gène *Arntl2*, de par son action sur l'expression d'*Il-21* ou d'autres mécanismes, agissait sur cette différence d'apoptose. Nous avons étudié le taux de cellules en apoptose, en séparant les cellules doubles négatives des doubles positives et des simples positives.

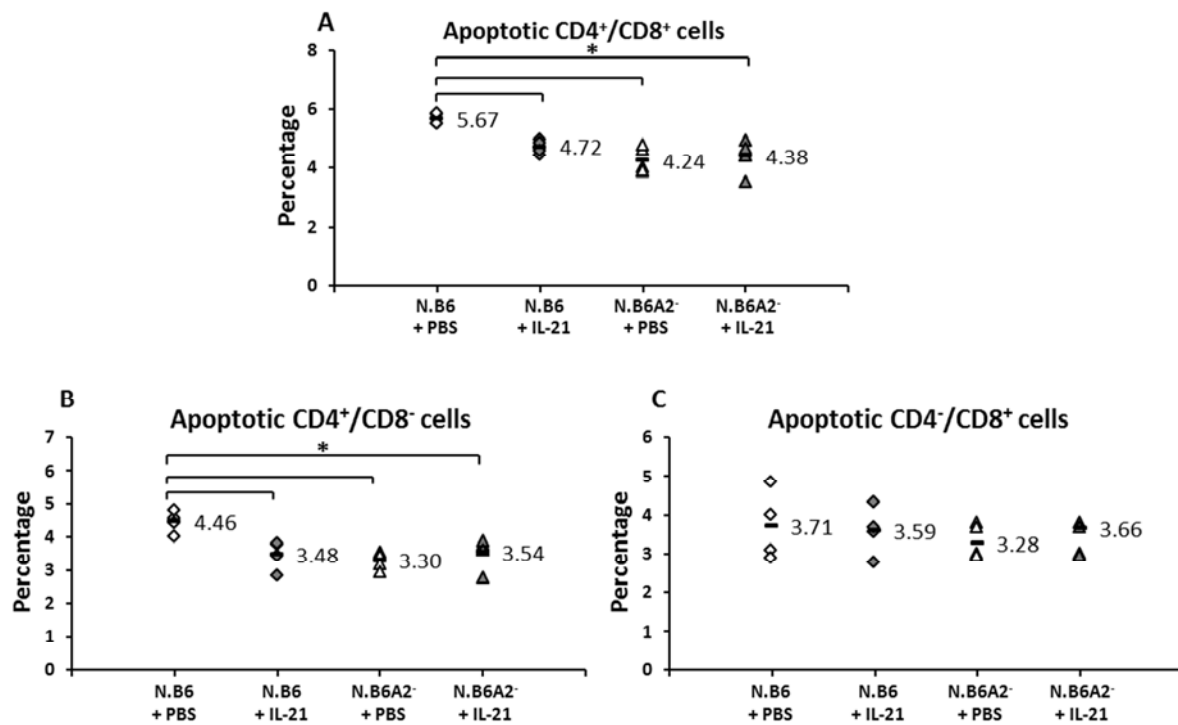
De façon très intéressante nous avons constaté que les taux d'apoptose, particulièrement au sein des cellules doubles positives  $CD4^+CD8^+$ , est largement plus élevés dans les lignées de souris porteuses de l'allèle *Arntl2* fonctionnel, ces différences sont l'exact opposé des proportions de cellules  $IL-17^+$  ou  $IL-21^+$ , les lignées avec un taux d'apoptose plus élevé dans le thymus présentant des taux plus faibles de cellules T effectrices.

Des études précédentes avaient identifié la zone *Idd6* et plus particulièrement *Idd6.1-Idd6.3* comme liée à la prolifération des lymphocytes T et à l'induction de l'apoptose, cette étude a permis de définir plus précisément ces effets apoptotiques sur les simples et doubles positifs à *Idd6* et *Idd6.3* [152] [151].

Ces différences de niveaux d'apoptose semblent donc fortement liées à la présence d'une forme fonctionnelle d'*Arntl2* et peuvent expliquer la mise en place de la différence de

proportion de cellules effectrices observée par la suite. L'absence d'ARNTL2 diminuerait donc l'apoptose, ce qui permettrait à un nombre plus élevé de cellules auto-réactives au sein des cellules effectrices de passer à travers la sélection négative dans le thymus, ce qui correspond à la plus grande proportion de ces cellules trouvée par la suite ainsi qu'à la plus grande capacité à la prolifération et à l'effet diabétogène observé pour les cellules des lignées sans ARNTL2 fonctionnelle. Cette différence peut ensuite être conservée par l'effet de contrôle de transcription d'ARNTL2 sur *Il-21* mais le fait de ne plus trouver de différences à partir de 12 semaines semble prouver que la diminution de la fonction de spécialisation des lymphocytes dans le thymus équilibre ces proportions dans les lignées de souris avec ou sans *Arntl2* fonctionnel.

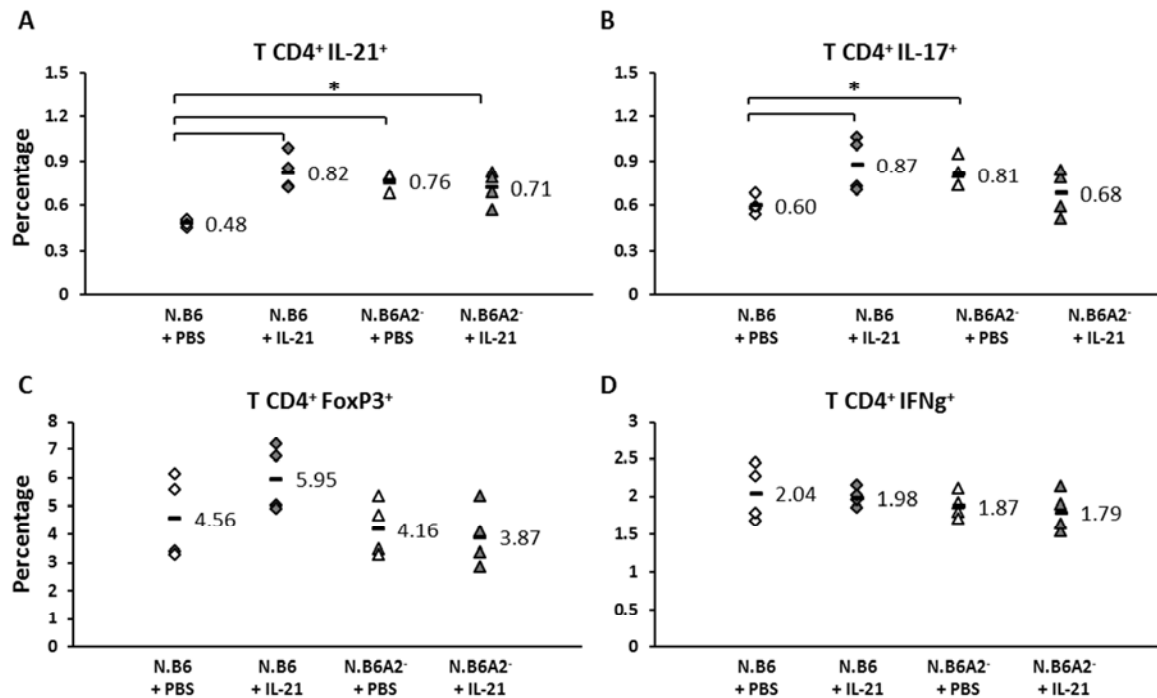
Sachant qu'IL-21 est déjà connue pour son action de protection contre l'apoptose [45] il nous était difficile de conclure à un rôle direct d'*Arntl2* ou à un effet indirect d'IL-21, la présence d'ARNTL2 agissant sur l'expression d'*Il-21* modifiant par la suite la survie des cellules. Pour tenter de répondre à cette question nous avons essayé d'injecter intra-péritonéalement à nos souris de l'IL-21 avant de recommencer à tester l'apoptose ainsi que les proportions des différents types de cellules immunitaires présentes. Or nous avons démontré que ces injections d'IL-21 sont suffisantes à elles seules pour diminuer l'apoptose dans les lignées disposant d'une version fonctionnelle d'*Arntl2*, ramenant ce pourcentage de cellules apoptotiques au même niveau que celui trouvé au sein des lignées porteuses d'une version non-fonctionnelle d'*Arntl2* et donc naturellement d'un taux plus élevé de cellules IL-21<sup>+</sup>. Cela tend à prouver que la différence d'apoptose observée est un effet indirect dû à une plus grande proportion de cellules IL-21<sup>+</sup> dont la sécrétion de cette cytokine va entraîner une protection contre l'apoptose. Dans le même temps nous avons observé que les injections d'IL-21 n'avaient pas d'effet sur la proportion d'apoptose des cellules des lignées avec un gène *Arntl2* inactivé (**Figure 35**).



**Figure 35 :** Proportions de cellules apoptotique parmi les cellules A) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, et C) CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup> dans les thymus de souris femelles de 3 semaines N.B6 ou N.B6A2<sup>-</sup>. Avec des injections quotidiennes 3 jours avant les tests de PBS ou d'IL-21 (12,5µg/kg). n=5. \*: p< 0,05.

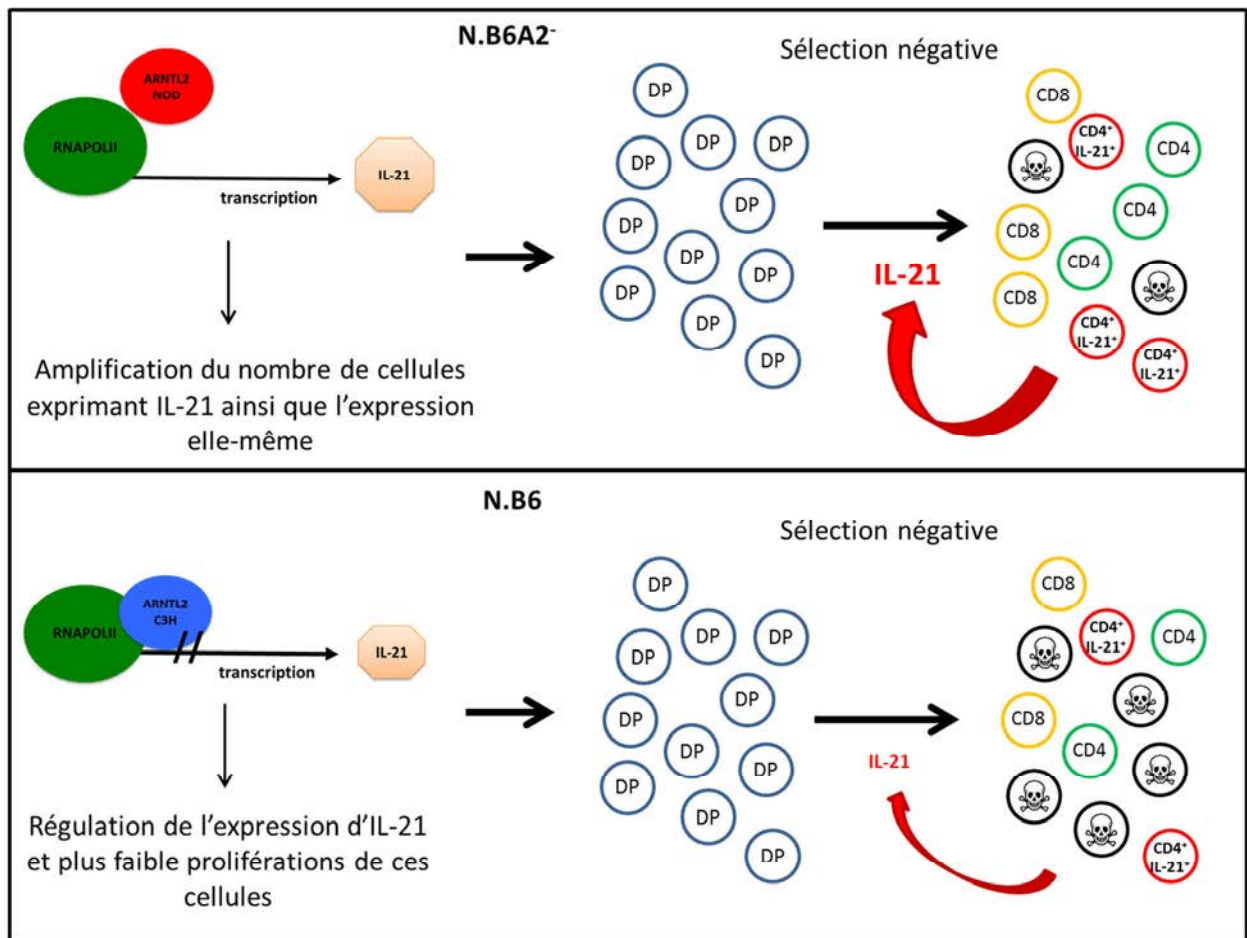
Dans ce même test nous avons également constaté que ces injections provoquaient une augmentation de la proportion des cellules IL-21<sup>+</sup> et IL-17<sup>+</sup> au sein de la lignée N.B6 atteignant les mêmes niveaux que ceux de la lignée N.B6A2<sup>-</sup>, mais celle-ci n'était pas modifiée par ces injections (**Figure 36**).





**Figure 36 :** Proportions de différents types de cellules immunitaires: A) CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup>, B) CD4<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup>, C) CD4<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> et D) CD4<sup>+</sup>IFNγ<sup>+</sup> dans le thymus de souris femelles de 3 semaines N.B6 et N.B6A2<sup>-</sup>. Avec des injections quotidiennes 3 jours avant les tests de PBS ou d'IL-21 (12,5μg/kg). n=4. \*: p<0,05.

Ces résultats laissent à penser que les effets de variations d'apoptose observés dans le cadre de nos tests, sont dus aux variations d'expression d'*Il-21* causées par *Arntl2*. Il semble également qu'il y a un effet seuil de la quantité d'IL-21, celle-ci n'étant plus efficace à partir d'une certaine quantité, peut-être à cause d'une saturation des récepteurs IL-21 à la surface des cellules. Cela est en partie confirmé par le fait que pendant la mise au point de ce test nous avons testé des doses supérieures d'IL-21 qui n'ont pas montré de résultats plus fort (Figure 37).



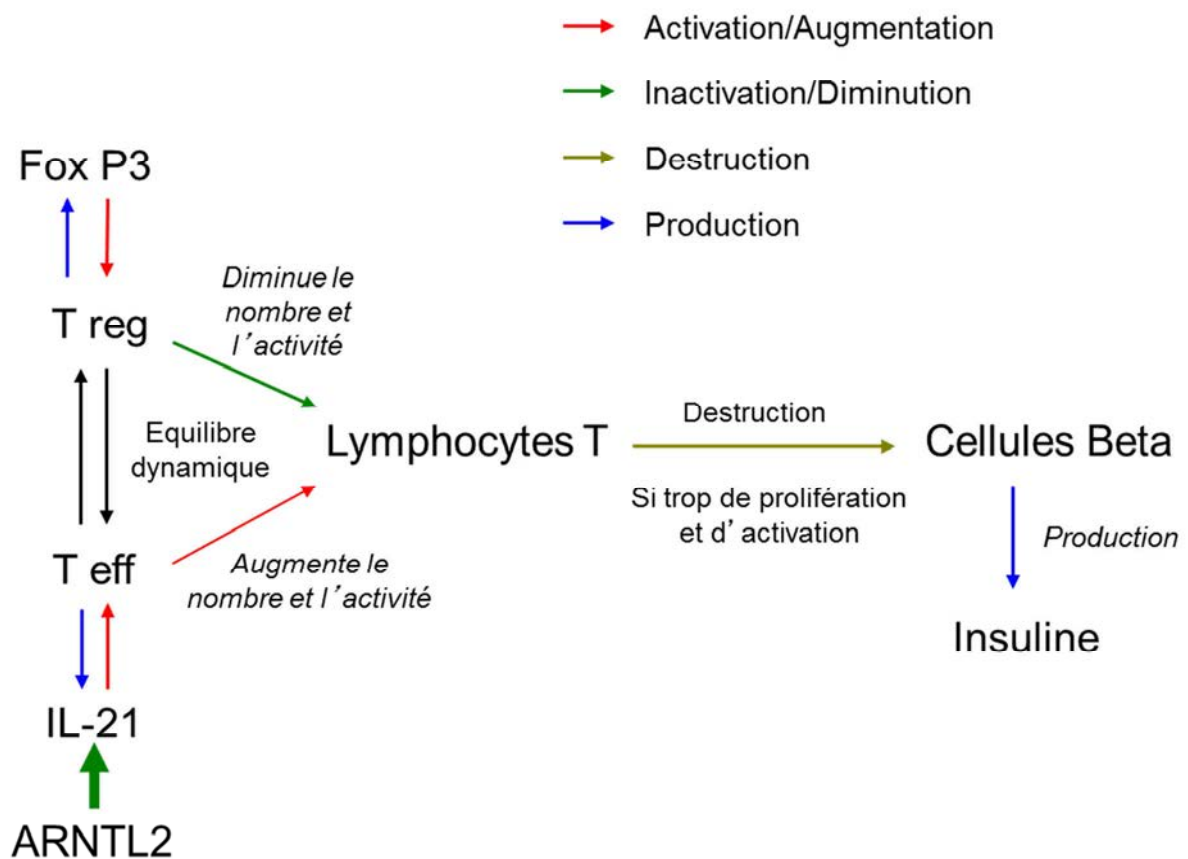
**Figure 37 :** Dans les lignées possédant une version non-fonctionnelle du gène *Arntl2* (comme la lignée N.B6A2<sup>-</sup>) l'absence de contrôle résultant en une expression plus élevée de ce gène pourrait conduire à une plus importante prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup>IL-21<sup>+</sup> ainsi qu'une plus grande production de cette cytokine. Au sein du thymus une plus grande quantité d'IL-21 pourrait agir par l'intermédiaire des récepteurs IL-21 à la surface des cellules et augmenter la résistance à l'apoptose des cellules ce qui entrainerait une plus grande survie lors de la sélection négative.

## 7. Conclusion générale : *Arntl2* joue un rôle dans la régulation de l'équilibre immunitaire

En conclusion, ces différentes analyses ont confirmé l'intérêt du gène *Arntl2* pour son rôle dans le développement du diabète de type 1. Au premier abord, l'absence de différence d'incidence de diabète spontané entre les lignées présentant un allèle *Arntl2* fonctionnel ou non peut sembler diminuer l'intérêt de ce gène, mais il est courant que des facteurs de prédisposition à une pathologie puissent être compensés dans des systèmes complexes sans que cela diminue l'intérêt de leur étude, dans notre cas cela peut être lié à la complexité génétique de la région *Idd6* ou à l'action âge-spécifique d'*Arntl2*.

On peut également se demander pourquoi, alors qu'il semble jouer un rôle important chez la souris NOD, *Arntl2* n'a pas été retrouvé lié au DT1 lors des études de GWAS chez l'homme. Mais il faut garder à l'esprit qu'un effet trop faible ou mitigé peut ne pas être détecté par cette technique, de plus le gène *Il-21*, ainsi qu'un taux supérieur de cellules IL-21<sup>+</sup>, ont été identifiés chez des patients atteints de DT1 [239] [240].

Cependant la suite de l'étude a prouvé que nous avons bien fait de continuer à nous concentrer sur ce gène, en effet, le fait d'avoir relié le diabète de type 1 avec des mécanismes comme la prolifération des lymphocytes effecteurs par IL-21 ainsi qu'avec la sélection de ces mêmes lymphocytes par la sélection négative dans le thymus peut sembler logique pour une maladie auto-immune, mais ce sont des pas en avant très importants dans la compréhension de cette maladie (**Figure 38**).



**Figure 38 :** Résumé schématique de l'action d'ARNTL2 sur l'équilibre immunitaire et l'activité potentiellement diabétogène des lymphocytes T.

L'interleukine-21 semble être un facteur clé de la régulation de l'équilibre immunitaire comme le prouvent les nombreuses études sur les maladies auto-immunes liées à sa dérégulation [63], comprendre son fonctionnement et particulièrement sa régulation pourra servir dans le futur pour s'adapter à ces changements voire même tenter de compenser les effets de ses modifications. Des perturbations de l'apoptose des cellules immunitaires étaient depuis longtemps soupçonnées de jouer un rôle dans le développement du diabète de type 1, nous avons ici trouvé un lien direct entre un gène lié à cette maladie et ce phénomène. De plus *Arntl2* est un gène lié au rythme circadien, ce qui est particulièrement intéressant pour cette pathologie car on s'aperçoit de plus en plus de son aspect circadien, comme pour beaucoup d'autres phénomènes liés au système immunitaire.

Il reste cependant encore de nombreuses lacunes à notre compréhension de tous ces mécanismes, tel que le rôle d'*Arntl2* dans d'autres types de cellules immunitaires, notamment les cellules présentatrices d'antigène ou l'effet plus précis d'*Arntl2* sur l'apoptose notamment par les mécanismes mis en jeu.

La suite du projet devrait donc consister en une étude plus poussée des mécanismes apoptotiques sous l'influence d'*Arntl2* et *Il-21*, ainsi qu'un suivi plus détaillé des proportions des différentes phases de développement des lymphocytes dans le thymus, afin de suivre leur prolifération et apoptose et les potentielles différences entre les lignées.

Nous avons également commencé les études chez l'homme afin d'identifier les cellules produisant ARNTL2 dans les cellules immunitaires du sang de donneurs sains. Cette étude va être réalisée sur un rythme circadien afin de suivre l'évolution de cette expression.

## Références bibliographiques

1. Shaw, J.E., R.A. Sicree, and P.Z. Zimmet, *Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030*. Diabetes Res Clin Pract, 2010. **87**(1): p. 4-14.
2. Bluestone, J.A., K. Herold, and G. Eisenbarth, *Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes*. Nature, 2010. **464**(7293): p. 1293-300.
3. Robertson, R.P., *Islet transplantation a decade later and strategies for filling a half-full glass*. Diabetes, 2010. **59**(6): p. 1285-91.
4. Smaglik, P., *Diabetes therapy boosts stem-cell campaign*. Nature, 2000. **406**(6793): p. 224.
5. Tisch, R. and H. McDevitt, *Insulin-dependent diabetes mellitus*. Cell, 1996. **85**(3): p. 291-7.
6. Mehers, K.L. and K.M. Gillespie, *The genetic basis for type 1 diabetes*. Br Med Bull, 2008. **88**(1): p. 115-29.
7. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
8. Matzinger, P., *The danger model: a renewed sense of self*. Science, 2002. **296**(5566): p. 301-5.
9. Litman, G.W., J.P. Cannon, and L.J. Dishaw, *Reconstructing immune phylogeny: new perspectives*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(11): p. 866-79.
10. Kawai, T. and S. Akira, *Innate immune recognition of viral infection*. Nat Immunol, 2006. **7**(2): p. 131-7.
11. Liszewski, M.K., et al., *Control of the complement system*. Adv Immunol, 1996. **61**: p. 201-83.
12. Parham, P., *Innate immunity: The unsung heroes*. Nature, 2003. **423**(6935): p. 20.
13. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
14. Krishnaswamy, G., O. Ajitawi, and D.S. Chi, *The human mast cell: an overview*. Methods Mol Biol, 2006. **315**: p. 13-34.
15. Pancer, Z. and M.D. Cooper, *The evolution of adaptive immunity*. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 497-518.
16. Janeway, C.A., Jr. and K. Bottomly, *Signals and signs for lymphocyte responses*. Cell, 1994. **76**(2): p. 275-85.
17. Steinmetz, M. and L. Hood, *Genes of the major histocompatibility complex in mouse and man*. Science, 1983. **222**(4625): p. 727-33.
18. Rock, K.L., S. Gamble, and L. Rothstein, *Presentation of exogenous antigen with class I major histocompatibility complex molecules*. Science, 1990. **249**(4971): p. 918-21.
19. Sproul, T.W., et al., *A role for MHC class II antigen processing in B cell development*. Int Rev Immunol, 2000. **19**(2-3): p. 139-55.
20. Kehry, M.R. and P.D. Hodgkin, *B-cell activation by helper T-cell membranes*. Crit Rev Immunol, 1994. **14**(3-4): p. 221-38.
21. Hertz, M., et al., *V(D)J recombinase induction in splenic B lymphocytes is inhibited by antigen-receptor signalling*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 292-5.
22. Harty, J.T., A.R. Tvinnereim, and D.W. White, *CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 275-308.
23. Radoja, S., A.B. Frey, and S. Vukmanovic, *T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(3): p. 265-90.

24. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
25. McHeyzer-Williams, L.J., L.P. Malherbe, and M.G. McHeyzer-Williams, *Helper T cell-regulated B cell immunity*. Curr Top Microbiol Immunol, 2006. **311**: p. 59-83.
26. Kovacs, B., et al., *Human CD8+ T cells do not require the polarization of lipid rafts for activation and proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 15006-11.
27. Jayaraman, S., Y. Luo, and M.E. Dorf, *Tolerance induction in T helper (Th1) cells by thymic macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(9): p. 2672-81.
28. Grewal, I.S. and R.A. Flavell, *CD40 and CD154 in cell-mediated immunity*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 111-35.
29. Gutcher, I. and B. Becher, *APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1119-27.
30. Hanabuchi, S., et al., *Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus*. J Immunol, 2010. **184**(6): p. 2999-3007.
31. Gavin, M.A., et al., *Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation*. Nature, 2007. **445**(7129): p. 771-5.
32. Jonuleit, H., et al., *Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood*. J Exp Med, 2001. **193**(11): p. 1285-94.
33. Sakaguchi, S. and F. Powrie, *Emerging challenges in regulatory T cell function and biology*. Science, 2007. **317**(5838): p. 627-9.
34. Hsieh, C.S., et al., *An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 401-10.
35. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, 1994. **265**(5176): p. 1237-40.
36. Wing, K., Z. Fehervari, and S. Sakaguchi, *Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells*. Int Immunol, 2006. **18**(7): p. 991-1000.
37. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity*. Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
38. Mucida, D., et al., *Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid*. Science, 2007. **317**(5835): p. 256-60.
39. Ahmed, R. and D. Gray, *Immunological memory and protective immunity: understanding their relation*. Science, 1996. **272**(5258): p. 54-60.
40. London, C.A., A.K. Abbas, and A. Kelso, *Helper T cell subsets: heterogeneity, functions and development*. Vet Immunol Immunopathol, 1998. **63**(1-2): p. 37-44.
41. Xu, X., et al., *Maturation and emigration of single-positive thymocytes*. Clin Dev Immunol, 2013. **2013**: p. 282870.
42. Hogquist, K.A., et al., *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. Cell, 1994. **76**(1): p. 17-27.
43. Starr, T.K., et al., *Thymocyte sensitivity and supramolecular activation cluster formation are developmentally regulated: a partial role for sialylation*. J Immunol, 2003. **171**(9): p. 4512-20.
44. Palmer, E., *Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(5): p. 383-91.
45. Rafei, M., et al., *Interleukin-21 accelerates thymic recovery from glucocorticoid-induced atrophy*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e72801.
46. Jacob, J. and D. Baltimore, *Modelling T-cell memory by genetic marking of memory T cells in vivo*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 593-7.

47. Schitteck, B. and K. Rajewsky, *Maintenance of B-cell memory by long-lived cells generated from proliferating precursors*. Nature, 1990. **346**(6286): p. 749-51.
48. Pullen, A.M., P. Marrack, and J.W. Kappler, *The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens*. Nature, 1988. **335**(6193): p. 796-801.
49. Hogquist, K.A., T.A. Baldwin, and S.C. Jameson, *Central tolerance: learning self-control in the thymus*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 772-82.
50. Curotto de Lafaille, M.A. and J.J. Lafaille, *Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?* Immunity, 2009. **30**(5): p. 626-35.
51. Sakaguchi, S., et al., *FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 490-500.
52. Ganguly, D., et al., *The role of dendritic cells in autoimmunity*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(8): p. 566-77.
53. Watanabe, N., et al., *Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+CD25+ regulatory T cells in human thymus*. Nature, 2005. **436**(7054): p. 1181-5.
54. Faustman, D., et al., *Abnormal T-lymphocyte subsets in type I diabetes*. Diabetes, 1989. **38**(11): p. 1462-8.
55. Tisch, R., et al., *Induction of GAD65-specific regulatory T-cells inhibits ongoing autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice*. Diabetes, 1998. **47**(6): p. 894-9.
56. Bergerot, I., et al., *Insulin B-chain reactive CD4+ regulatory T-cells induced by oral insulin treatment protect from type I diabetes by blocking the cytokine secretion and pancreatic infiltration of diabetogenic effector T-cells*. Diabetes, 1999. **48**(9): p. 1720-9.
57. Jaeckel, E., H. von Boehmer, and M.P. Manns, *Antigen-specific FoxP3-transduced T-cells can control established type I diabetes*. Diabetes, 2005. **54**(2): p. 306-10.
58. Akdis, M., et al., *Interleukins, from 1 to 37, and interferon-gamma: receptors, functions, and roles in diseases*. J Allergy Clin Immunol, 2011. **127**(3): p. 701-21.e1-70.
59. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, 2003. **299**(5609): p. 1057-61.
60. Purvis, H.A., et al., *A negative feedback loop mediated by STAT3 limits human Th17 responses*. J Immunol, 2014. **193**(3): p. 1142-50.
61. Zeng, R., et al., *The molecular basis of IL-21-mediated proliferation*. Blood, 2007. **109**(10): p. 4135-42.
62. Spolski, R., et al., *IL-21 signaling is critical for the development of type I diabetes in the NOD mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(37): p. 14028-33.
63. Spolski, R. and W.J. Leonard, *Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(5): p. 379-95.
64. Ozaki, K., et al., *Regulation of B cell differentiation and plasma cell generation by IL-21, a novel inducer of Blimp-1 and Bcl-6*. J Immunol, 2004. **173**(9): p. 5361-71.
65. Frederiksen, K.S., et al., *IL-21 induces in vivo immune activation of NK cells and CD8(+) T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(10): p. 1439-49.
66. McGuire, H.M., et al., *Loss of parity between IL-2 and IL-21 in the NOD Idd3 locus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(46): p. 19438-43.
67. Spolski, R. and W.J. Leonard, *The Yin and Yang of interleukin-21 in allergy, autoimmunity and cancer*. Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 295-301.
68. Sutherland, A.P., et al., *Interleukin-21 is required for the development of type I diabetes in NOD mice*. Diabetes, 2009. **58**(5): p. 1144-55.



69. Ostiguy, V., et al., *IL-21 promotes T lymphocyte survival by activating the phosphatidylinositol-3 kinase signaling cascade*. J Leukoc Biol, 2007. **82**(3): p. 645-56.
70. Sofi, M.H., et al., *Regulation of IL-17 expression by the developmental pathway of CD4 T cells in the thymus*. Mol Immunol, 2010. **47**(6): p. 1262-8.
71. Deenick, E.K. and S.G. Tangye, *Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation*. Immunol Cell Biol, 2007. **85**(7): p. 503-5.
72. Monteleone, G., F. Pallone, and T.T. Macdonald, *Interleukin-21 as a new therapeutic target for immune-mediated diseases*. Trends Pharmacol Sci, 2009. **30**(8): p. 441-7.
73. Peluso, I., et al., *IL-21 counteracts the regulatory T cell-mediated suppression of human CD4+ T lymphocytes*. J Immunol, 2007. **178**(2): p. 732-9.
74. Feng, G., et al., *Interleukin-21 mediates hepatitis B virus-associated liver cirrhosis by activating hepatic stellate cells*. Hepatol Res, 2014. **44**(10): p. E198-205.
75. Wei, L., et al., *IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner*. J Biol Chem, 2007. **282**(48): p. 34605-10.
76. von Herrath, M., *Immunology: insulin trigger for diabetes*. Nature, 2005. **435**(7039): p. 151-2.
77. Mathis, D., L. Vence, and C. Benoist, *beta-Cell death during progression to diabetes*. Nature, 2001. **414**(6865): p. 792-8.
78. Cooke, D.W. and L. Plotnick, *Type 1 diabetes mellitus in pediatrics*. Pediatr Rev, 2008. **29**(11): p. 374-84; quiz 385.
79. Rioux, J.D. and A.K. Abbas, *Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease*. Nature, 2005. **435**(7042): p. 584-9.
80. Knip, M., et al., *Environmental triggers and determinants of type 1 diabetes*. Diabetes, 2005. **54 Suppl 2**: p. S125-36.
81. Lander, E.S., *Initial impact of the sequencing of the human genome*. Nature, 2011. **470**(7333): p. 187-97.
82. Eleftherohorinou, H., et al., *Pathway analysis of GWAS provides new insights into genetic susceptibility to 3 inflammatory diseases*. PLoS One, 2009. **4**(11): p. e8068.
83. Cudworth, A.G. and J.C. Woodrow, *Evidence for HL-A-linked genes in "juvenile" diabetes mellitus*. Br Med J, 1975. **3**(5976): p. 133-5.
84. Nerup, J., et al., *HL-A antigens and diabetes mellitus*. Lancet, 1974. **2**(7885): p. 864-6.
85. Singal, D.P. and M.A. Blajchman, *Histocompatibility (HL-A) antigens, lymphocytotoxic antibodies and tissue antibodies in patients with diabetes mellitus*. Diabetes, 1973. **22**(6): p. 429-32.
86. Bell, G.I., S. Horita, and J.H. Karam, *A polymorphic locus near the human insulin gene is associated with insulin-dependent diabetes mellitus*. Diabetes, 1984. **33**(2): p. 176-83.
87. Nistico, L., et al., *The CTLA-4 gene region of chromosome 2q33 is linked to, and associated with, type 1 diabetes*. Belgian Diabetes Registry. Hum Mol Genet, 1996. **5**(7): p. 1075-80.
88. Bottini, N., et al., *A functional variant of lymphoid tyrosine phosphatase is associated with type I diabetes*. Nat Genet, 2004. **36**(4): p. 337-8.
89. Vella, A., et al., *Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(5): p. 773-9.
90. Smyth, D.J., et al., *A genome-wide association study of nonsynonymous SNPs identifies a type 1 diabetes locus in the interferon-induced helicase (IFIH1) region*. Nat Genet, 2006. **38**(6): p. 617-9.
91. Risch, N. and K. Merikangas, *The future of genetic studies of complex human diseases*. Science, 1996. **273**(5281): p. 1516-7.

92. Altmuller, J., et al., *Genomewide scans of complex human diseases: true linkage is hard to find*. Am J Hum Genet, 2001. **69**(5): p. 936-50.
93. Concannon, P., S.S. Rich, and G.T. Nepom, *Genetics of type 1A diabetes*. N Engl J Med, 2009. **360**(16): p. 1646-54.
94. Todd, J.A., et al., *Robust associations of four new chromosome regions from genome-wide analyses of type 1 diabetes*. Nat Genet, 2007. **39**(7): p. 857-64.
95. Santin, I. and D.L. Eizirik, *Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and beta-cell apoptosis*. Diabetes Obes Metab, 2013. **15 Suppl 3**: p. 71-81.
96. Concannon, P., et al., *Type 1 diabetes: evidence for susceptibility loci from four genome-wide linkage scans in 1,435 multiplex families*. Diabetes, 2005. **54**(10): p. 2995-3001.
97. Pugliese, A., et al., *The insulin gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDDMM2 susceptibility locus for type 1 diabetes*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 293-7.
98. Vafiadis, P., et al., *Insulin expression in human thymus is modulated by INS VNTR alleles at the IDDM2 locus*. Nat Genet, 1997. **15**(3): p. 289-92.
99. Kent, S.C., et al., *Expanded T cells from pancreatic lymph nodes of type 1 diabetic subjects recognize an insulin epitope*. Nature, 2005. **435**(7039): p. 224-8.
100. Palmer, J.P., et al., *Insulin antibodies in insulin-dependent diabetics before insulin treatment*. Science, 1983. **222**(4630): p. 1337-9.
101. Tree, T.I. and M. Peakman, *Autoreactive T cells in human type 1 diabetes*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2004. **33**(1): p. 113-33, ix-x.
102. Wegmann, D.R., M. Norbury-Glaser, and D. Daniel, *Insulin-specific T cells are a predominant component of islet infiltrates in pre-diabetic NOD mice*. Eur J Immunol, 1994. **24**(8): p. 1853-7.
103. Haskins, K. and D. Wegmann, *Diabetogenic T-cell clones*. Diabetes, 1996. **45**(10): p. 1299-305.
104. Fortune, M.D., H. Guo, and O. Burren, *Statistical colocalization of genetic risk variants for related autoimmune diseases in the context of common controls*. 2015.
105. Todd, J.A., *Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes*. Immunol Today, 1990. **11**(4): p. 122-9.
106. Notkins, A.L., *On the track of viruses*. Nature, 1984. **311**(5983): p. 209-10.
107. Shimada, A. and T. Maruyama, *Encephalomyocarditis-virus-induced diabetes model resembles "fulminant" type 1 diabetes in humans*. Diabetologia, 2004. **47**(10): p. 1854-5.
108. Boettler, T. and M. von Herrath, *Protection against or triggering of Type 1 diabetes? Different roles for viral infections*. Expert Rev Clin Immunol, 2011. **7**(1): p. 45-53.
109. Donner, H., et al., *CTLA4 alanine-17 confers genetic susceptibility to Graves' disease and to type 1 diabetes mellitus*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(1): p. 143-6.
110. Fairweather, D. and N.R. Rose, *Type 1 diabetes: virus infection or autoimmune disease?* Nat Immunol, 2002. **3**(4): p. 338-40.
111. Okada, K., et al., *Prevalence and risk factors for diabetes: a ten year follow-up study of the Yaeyama district of Okinawa*. Fukuoka Igaku Zasshi, 2010. **101**(10): p. 215-24.
112. Cardwell, C.R., et al., *Maternal age at birth and childhood type 1 diabetes: a pooled analysis of 30 observational studies*. Diabetes, 2010. **59**(2): p. 486-94.
113. Hettiarachchi, K.D., P.Z. Zimmet, and M.A. Myers, *Dietary toxins, endoplasmic reticulum (ER) stress and diabetes*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(2): p. 146-56.

114. Bach, J.F. and L. Chatenoud, *The hygiene hypothesis: an explanation for the increased frequency of insulin-dependent diabetes*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2012. **2**(2): p. a007799.
115. Bach, J.F., *Immunotherapy of type 1 diabetes: lessons for other autoimmune diseases*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S3-15.
116. Klein, R.J., et al., *Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration*. Science, 2005. **308**(5720): p. 385-9.
117. Johnson, A.D. and C.J. O'Donnell, *An open access database of genome-wide association results*. BMC Med Genet, 2009. **10**: p. 6.
118. Pociot, F., et al., *Genetics of type 1 diabetes: what's next?* Diabetes, 2010. **59**(7): p. 1561-71.
119. Bortell, R. and C. Yang, *The BB rat as a model of human type 1 diabetes*. Methods Mol Biol, 2012. **933**: p. 31-44.
120. Makino, S., et al., *Effect of castration on the appearance of diabetes in NOD mouse*. Jikken Dobutsu, 1981. **30**(2): p. 137-40.
121. Yurkovetskiy, L., et al., *Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota*. Immunity, 2013. **39**(2): p. 400-12.
122. Markle, J.G., et al., *Sex differences in the gut microbiome drive hormone-dependent regulation of autoimmunity*. Science, 2013. **339**(6123): p. 1084-8.
123. Jayasimhan, A., K.P. Mansour, and R.M. Slaterry, *Advances in our understanding of the pathophysiology of Type 1 diabetes: lessons from the NOD mouse*. Clin Sci (Lond), 2014. **126**(1): p. 1-18.
124. Shoda, L.K., et al., *A comprehensive review of interventions in the NOD mouse and implications for translation*. Immunity, 2005. **23**(2): p. 115-26.
125. Suri, A., et al., *Natural peptides selected by diabetogenic DQ8 and murine I-A(g7) molecules show common sequence specificity*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2268-76.
126. Lieberman, S.M., et al., *Identification of the beta cell antigen targeted by a prevalent population of pathogenic CD8+ T cells in autoimmune diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(14): p. 8384-8.
127. Standifer, N.E., et al., *Identification of Novel HLA-A\*0201-restricted epitopes in recent-onset type 1 diabetic subjects and antibody-positive relatives*. Diabetes, 2006. **55**(11): p. 3061-7.
128. He, Q., et al., *Thymic development of autoreactive T cells in NOD mice is regulated in an age-dependent manner*. J Immunol, 2013. **191**(12): p. 5858-66.
129. Anderson, M.S. and J.A. Bluestone, *The NOD mouse: a model of immune dysregulation*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 447-85.
130. Serreze, D.V., et al., *Use of recombinant congenic and congenic strains of NOD mice to identify a new insulin-dependent diabetes resistance gene*. J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1553-8.
131. Rogner, U.C. and P. Avner, *Congenic mice: cutting tools for complex immune disorders*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(3): p. 243-52.
132. Brodnicki, T.C., F. Quirk, and G. Morahan, *A susceptibility allele from a non-diabetes-prone mouse strain accelerates diabetes in NOD congenic mice*. Diabetes, 2003. **52**(1): p. 218-22.
133. Chen, Y.G., et al., *Idd9/11 genetic locus regulates diabetogenic activity of CD4 T-cells in nonobese diabetic (NOD) mice*. Diabetes, 2008. **57**(12): p. 3273-80.
134. Mangada, J., et al., *Idd loci synergize to prolong islet allograft survival induced by costimulation blockade in NOD mice*. Diabetes, 2009. **58**(1): p. 165-73.
135. Morin, J., et al., *Mapping of the murine type 1 diabetes locus Idd20 by genetic interaction*. Mamm Genome, 2006. **17**(11): p. 1105-12.

136. Galli-Taliadoros, L.A., et al., *Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice*. J Immunol Methods, 1995. **181**(1): p. 1-15.
137. Austin, C.P., et al., *The knockout mouse project*. Nat Genet, 2004. **36**(9): p. 921-4.
138. Boettcher, M. and M.T. McManus, *Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR*. Mol Cell, 2015. **58**(4): p. 575-585.
139. Gaj, T., C.A. Gersbach, and C.F. Barbas, 3rd, *ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering*. Trends Biotechnol, 2013. **31**(7): p. 397-405.
140. Bedell, V.M., et al., *In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 114-8.
141. Boch, J., *TALEs of genome targeting*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(2): p. 135-6.
142. Doudna, J.A. and E. Charpentier, *Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9*. Science, 2014. **346**(6213): p. 1258096.
143. Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. Cell, 2014. **157**(6): p. 1262-78.
144. Sander, J.D. and J.K. Joung, *CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes*. Nat Biotechnol, 2014. **32**(4): p. 347-55.
145. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. Science, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
146. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. Science, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
147. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(9): p. 827-32.
148. Wang, H., et al., *One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell, 2013. **153**(4): p. 910-8.
149. Yang, H., et al., *One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering*. Cell, 2013. **154**(6): p. 1370-9.
150. Rogner, U.C., et al., *Three loci on mouse chromosome 6 influence onset and final incidence of type I diabetes in NOD.C3H congenic strains*. Genomics, 2001. **74**(2): p. 163-71.
151. Penha-Goncalves, C., et al., *Type 1 diabetes and the control of dexamethazone-induced apoptosis in mice maps to the same region on chromosome 6*. Genomics, 1995. **28**(3): p. 398-404.
152. Bergman, M.L., et al., *Diabetes protection and restoration of thymocyte apoptosis in NOD Idd6 congenic strains*. Diabetes, 2003. **52**(7): p. 1677-82.
153. Bergman, M.L., et al., *Low rate of proliferation in immature thymocytes of the non-obese diabetic mouse maps to the Idd6 diabetes susceptibility region*. Diabetologia, 2001. **44**(8): p. 1054-61.
154. Grimm, C.H., U.C. Rogner, and P. Avner, *Lrmp and Bcat1 are candidates for the type I diabetes susceptibility locus Idd6*. Autoimmunity, 2003. **36**(4): p. 241-6.
155. Vallois, D., et al., *The type 1 diabetes locus Idd6 controls TLR1 expression*. J Immunol, 2007. **179**(6): p. 3896-903.
156. Rogner, U.C., et al., *The diabetes type 1 locus Idd6 modulates activity of CD4+CD25+ regulatory T-cells*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 186-92.
157. Boitard, C., et al., *T cell-mediated inhibition of the transfer of autoimmune diabetes in NOD mice*. J Exp Med, 1989. **169**(5): p. 1669-80.
158. Hung, M.S., P. Avner, and U.C. Rogner, *Identification of the transcription factor ARNTL2 as a candidate gene for the type 1 diabetes locus Idd6*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(18): p. 2732-42.
159. Gunton, J.E., et al., *Loss of ARNT/HIF1beta mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes*. Cell, 2005. **122**(3): p. 337-49.

160. Levisetti, M.G. and K.S. Polonsky, *Diabetic pancreatic beta cells ARNT all they should be*. Cell Metab, 2005. **2**(2): p. 78-80.
161. Phillips, M.L., *Circadian rhythms: Of owls, larks and alarm clocks*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 142-4.
162. Clayton, J.D., C.P. Kyriacou, and S.M. Reppert, *Keeping time with the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 829-31.
163. Silver, R., et al., *A diffusible coupling signal from the transplanted suprachiasmatic nucleus controlling circadian locomotor rhythms*. Nature, 1996. **382**(6594): p. 810-3.
164. Nagoshi, E., et al., *Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells*. Cell, 2004. **119**(5): p. 693-705.
165. Le Minh, N., et al., *Glucocorticoid hormones inhibit food-induced phase-shifting of peripheral circadian oscillators*. Embo j, 2001. **20**(24): p. 7128-36.
166. Ishida, A., et al., *Light activates the adrenal gland: timing of gene expression and glucocorticoid release*. Cell Metab, 2005. **2**(5): p. 297-307.
167. Kalsbeek, A., S. la Fleur, and E. Fliers, *Circadian control of glucose metabolism*. Mol Metab, 2014. **3**(4): p. 372-83.
168. Qian, J., et al., *Consequences of exposure to light at night on the pancreatic islet circadian clock and function in rats*. Diabetes, 2013. **62**(10): p. 3469-78.
169. Stephan, F.K. and I. Zucker, *Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic lesions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1972. **69**(6): p. 1583-6.
170. Allada, R., et al., *Stopping time: the genetics of fly and mouse circadian clocks*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 1091-119.
171. Sahar, S. and P. Sassone-Corsi, *Metabolism and cancer: the circadian clock connection*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(12): p. 886-96.
172. Ptashne, M. and A. Gann, *Transcriptional activation by recruitment*. Nature, 1997. **386**(6625): p. 569-77.
173. Brivanlou, A.H. and J.E. Darnell, Jr., *Signal transduction and the control of gene expression*. Science, 2002. **295**(5556): p. 813-8.
174. Dardente, H., et al., *Cryptochromes impair phosphorylation of transcriptional activators in the clock: a general mechanism for circadian repression*. Biochem J, 2007. **402**(3): p. 525-36.
175. Reisz-Porszasz, S., et al., *Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)*. Mol Cell Biol, 1994. **14**(9): p. 6075-86.
176. Gekakis, N., et al., *Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism*. Science, 1998. **280**(5369): p. 1564-9.
177. Feng, D. and M.A. Lazar, *Clocks, metabolism, and the epigenome*. Mol Cell, 2012. **47**(2): p. 158-67.
178. Gale, J.E., et al., *Disruption of circadian rhythms accelerates development of diabetes through pancreatic beta-cell loss and dysfunction*. J Biol Rhythms, 2011. **26**(5): p. 423-33.
179. Ko, C.H. and J.S. Takahashi, *Molecular components of the mammalian circadian clock*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 2**: p. R271-7.
180. Woon, P.Y., et al., *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like (BMAL1) is associated with susceptibility to hypertension and type 2 diabetes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(36): p. 14412-7.
181. Marcheva, B., et al., *Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes*. Nature, 2010. **466**(7306): p. 627-31.

182. Pappa, K.I., et al., *The major circadian pacemaker ARNT-like protein-1 (BMAL1) is associated with susceptibility to gestational diabetes mellitus*. Diabetes Res Clin Pract, 2013. **99**(2): p. 151-7.
183. Narasimamurthy, R., et al., *Circadian clock protein cryptochrome regulates the expression of proinflammatory cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(31): p. 12662-7.
184. Karthikeyan, R., et al., *Per3 length polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus*. Horm Mol Biol Clin Investig, 2014. **18**(3): p. 145-9.
185. Kerkvliet, N.I., et al., *Activation of aryl hydrocarbon receptor by TCDD prevents diabetes in NOD mice and increases Foxp3+ T cells in pancreatic lymph nodes*. Immunotherapy, 2009. **1**(4): p. 539-47.
186. Quintana, F.J., et al., *Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 65-71.
187. Veldhoen, M., et al., *The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 106-9.
188. Panda, S., et al., *Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock*. Cell, 2002. **109**(3): p. 307-20.
189. Stokkan, K.A., et al., *Entrainment of the circadian clock in the liver by feeding*. Science, 2001. **291**(5503): p. 490-3.
190. Damiola, F., et al., *Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 2950-61.
191. Lamia, K.A., K.F. Storch, and C.J. Weitz, *Physiological significance of a peripheral tissue circadian clock*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 15172-7.
192. Shi, S.Q., et al., *Circadian disruption leads to insulin resistance and obesity*. Curr Biol, 2013. **23**(5): p. 372-81.
193. Shi, S., et al., *Circadian clock gene Bmal1 is not essential; functional replacement with its paralog, Bmal2*. Curr Biol, 2010. **20**(4): p. 316-21.
194. Curtis, A.M., et al., *Circadian clock proteins and immunity*. Immunity, 2014. **40**(2): p. 178-86.
195. Kirk, H., *Mitotic activity and cell degeneration in the mouse thymus over a period of 24 hrs*. Z Zellforsch Mikrosk Anat, 1972. **129**(2): p. 188-95.
196. Alvarez, J.D. and A. Sehgal, *The thymus is similar to the testis in its pattern of circadian clock gene expression*. J Biol Rhythms, 2005. **20**(2): p. 111-21.
197. Yu, X., et al., *TH17 cell differentiation is regulated by the circadian clock*. Science, 2013. **342**(6159): p. 727-30.
198. Nguyen, K.D., et al., *Circadian gene Bmal1 regulates diurnal oscillations of Ly6C(hi) inflammatory monocytes*. Science, 2013. **341**(6153): p. 1483-8.
199. Gilbert, S.S., C.J. van den Heuvel, and D. Dawson, *Daytime melatonin and temazepam in young adult humans: equivalent effects on sleep latency and body temperatures*. J Physiol, 1999. **514** ( Pt 3): p. 905-14.
200. Hemmers, S. and A.Y. Rudensky, *The Cell-Intrinsic Circadian Clock Is Dispensable for Lymphocyte Differentiation and Function*. Cell Rep, 2015. **11**(9): p. 1339-1349.
201. Cutolo, M., et al., *Circadian melatonin and cortisol levels in rheumatoid arthritis patients in winter time: a north and south Europe comparison*. Ann Rheum Dis, 2005. **64**(2): p. 212-6.
202. Afkhamizadeh, M., M. Sahebari, and S.R. Seyyed-Hoseini, *Morning melatonin serum values do not correlate with disease activity in rheumatoid arthritis: a cross-sectional study*. Rheumatol Int, 2014. **34**(8): p. 1145-51.

203. Toth, L.A., *Sleep, sleep deprivation and infectious disease: studies in animals*. Adv Neuroimmunol, 1995. **5**(1): p. 79-92.
204. Adams, K.L., et al., *Environmental circadian disruption elevates the IL-6 response to lipopolysaccharide in blood*. J Biol Rhythms, 2013. **28**(4): p. 272-7.
205. Keller, M., et al., *A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(50): p. 21407-12.
206. Gibbs, J.E., et al., *The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. 582-7.
207. Kirsch, S., et al., *T-cell numbers and antigen-specific T-cell function follow different circadian rhythms*. J Clin Immunol, 2012. **32**(6): p. 1381-9.
208. He, C.X., et al., *Inhibition of type 1 diabetes by upregulation of the circadian rhythm-related aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2*. Immunogenetics, 2010. **62**(9): p. 585-92.
209. He, C.X., et al., *Downregulation of the circadian rhythm related gene Arntl2 suppresses diabetes protection in Idd6 NOD.C3H congenic mice*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010. **37**(12): p. 1154-8.
210. Bouatia-Naji, N., et al., *A variant near MTNR1B is associated with increased fasting plasma glucose levels and type 2 diabetes risk*. Nat Genet, 2009. **41**(1): p. 89-94.
211. Das, S.K., et al., *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) gene as a positional and functional candidate for type 2 diabetes and prediabetic intermediate traits: Mutation detection, case-control studies, and gene expression analysis*. BMC Med Genet, 2008. **9**: p. 16.
212. Gibbs, J.E. and D.W. Ray, *The role of the circadian clock in rheumatoid arthritis*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(1): p. 205.
213. Hogenesch, J.B., et al., *The basic helix-loop-helix-PAS protein MOP9 is a brain-specific heterodimeric partner of circadian and hypoxia factors*. J Neurosci, 2000. **20**(13): p. RC83.
214. Maemura, K., et al., *CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression*. J Biol Chem, 2000. **275**(47): p. 36847-51.
215. Okano, T., M. Sasaki, and Y. Fukada, *Cloning of mouse BMAL2 and its daily expression profile in the suprachiasmatic nucleus: a remarkable acceleration of Bmal2 sequence divergence after Bmal gene duplication*. Neurosci Lett, 2001. **300**(2): p. 111-4.
216. Ikeda, M., et al., *cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: its mRNA expression, subcellular distribution, and chromosomal localization*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **275**(2): p. 493-502.
217. Schoenhard, J.A., et al., *Regulation of the PAI-1 promoter by circadian clock components: differential activation by BMAL1 and BMAL2*. J Mol Cell Cardiol, 2003. **35**(5): p. 473-81.
218. Takeda, N., et al., *Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 2007. **282**(45): p. 32561-7.
219. Schoenhard, J.A., et al., *Alternative splicing yields novel BMAL2 variants: tissue distribution and functional characterization*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**(1): p. C103-14.
220. Yeh, C.T., et al., *Antisense overexpression of BMAL2 enhances cell proliferation*. Oncogene, 2003. **22**(34): p. 5306-14.

221. Sasaki, M., et al., *Preferential inhibition of BMAL2-CLOCK activity by PER2 reemphasizes its negative role and a positive role of BMAL2 in the circadian transcription*. J Biol Chem, 2009. **284**(37): p. 25149-59.
222. Cermakian, N., et al., *Asynchronous oscillations of two zebrafish CLOCK partners reveal differential clock control and function*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p. 4339-44.
223. Lazado, C.C., et al., *In vitro and ex vivo models indicate that the molecular clock in fast skeletal muscle of Atlantic cod is not autonomous*. Mol Biol Rep, 2014. **41**(10): p. 6679-89.
224. Lazado, C.C., et al., *Daily rhythmicity of clock gene transcripts in atlantic cod fast skeletal muscle*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99172.
225. Ciarleglio, C.M., et al., *Genetic differences in human circadian clock genes among worldwide populations*. J Biol Rhythms, 2008. **23**(4): p. 330-40.
226. Partonen, T., *Clock gene variants in mood and anxiety disorders*. J Neural Transm, 2012. **119**(10): p. 1133-45.
227. Ding, H., et al., *Decreased expression of Bmal2 in patients with Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2011. **499**(3): p. 186-8.
228. Kovanen, L., et al., *Circadian clock gene polymorphisms in alcohol use disorders and alcohol consumption*. Alcohol Alcohol, 2010. **45**(4): p. 303-11.
229. Shi, J., et al., *Clock genes may influence bipolar disorder susceptibility and dysfunctional circadian rhythm*. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2008. **147B**(7): p. 1047-55.
230. Mazzocchi, G., et al., *Altered expression of the clock gene machinery in kidney cancer patients*. Biomed Pharmacother, 2012. **66**(3): p. 175-9.
231. Mazzocchi, G., et al., *ARNTL2 and SERPINE1: potential biomarkers for tumor aggressiveness in colorectal cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2012. **138**(3): p. 501-11.
232. Kouri, V.P., et al., *Circadian timekeeping is disturbed in rheumatoid arthritis at molecular level*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e54049.
233. Steward, C.A., et al., *The non-obese diabetic mouse sequence, annotation and variation resource: an aid for investigating type 1 diabetes*. Database (Oxford), 2013. **2013**: p. bat032.
234. Lebailly, B., C. He, and U.C. Rogner, *Linking the circadian rhythm gene Arntl2 to interleukin 21 expression in type 1 diabetes*. Diabetes, 2014. **63**(6): p. 2148-57.
235. Asano, K., et al., *The gene for human IL-21 and genetic susceptibility to type 1 diabetes in the Japanese*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1079**: p. 47-50.
236. Ferreira, R.C., et al., *IL-21 production by CD4(+) effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients*. Diabetologia, 2015. **58**(4): p. 781-90.
237. Vallois, D., et al., *Influence of a non-NK complex region of chromosome 6 on CD4+ invariant NK T cell homeostasis*. J Immunol, 2008. **181**(3): p. 1753-9.
238. Bergman, M.L., et al., *CTLA-4-/- mice display T cell-apoptosis resistance resembling that ascribed to autoimmune-prone non-obese diabetic (NOD) mice*. J Autoimmun, 2001. **16**(2): p. 105-13.
239. Ferreira, R.C., et al., *IL-21 production by CD4+ effector T cells and frequency of circulating follicular helper T cells are increased in type 1 diabetes patients*. Diabetologia, 2015. **58**(4): p. 781-90.
240. Kenefeck, R., et al., *Follicular helper T cell signature in type 1 diabetes*. J Clin Invest, 2015. **125**(1): p. 292-303.





## Résumé de la thèse

Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune complexe faisant intervenir des facteurs environnementaux et génétiques pour laquelle de nombreuses mutations causatives restent à identifier. Le locus *Idd6* sur lequel notre laboratoire se concentre est l'un de la quarantaine de loci génétiques du diabète de type 1 identifiés chez la souris NOD (non-obèse diabétique), modèle développant un diabète proche de celui de l'homme. Comme chez l'homme le système immunitaire de ces souris détruit ses propres cellules  $\beta$  insulino-sécrétrices du pancréas. De par l'étude de lignées de souris congéniques, le gène *Arntl2* (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator-Like 2) un facteur de transcription lié au rythme circadien a été identifié comme un gène candidat au diabète de type 1 notamment car plusieurs polymorphismes et variations d'épissage ont été identifiés en comparant le gène et ses transcrits dans les lignées NOD et C3H. Les tests suivants ont permis de prouver que ce gène apportait une protection contre le diabète de type 1. Par la suite des analyses de puce d'expression ont permis d'identifier les gènes régulés par ce facteur de transcription, parmi eux se trouvait un excellent gène candidat, l'interleukine-21, responsable de la prolifération des lymphocytes T  $CD4^+$ , en partie responsable de la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas dans le diabète.

Mon projet de thèse a donc consisté à étudier comment les allèles NOD et C3H d'*Arntl2* contrôlaient l'expression d'*Il-21*, en quoi cela affectait le système immunitaire dans son ensemble ainsi que la capacité diabéto-gène des lymphocytes.

Dans un premier temps l'analyse des composantes immunitaires des lignées de souris a montré que les souris avec un allèle C3H en *Idd6.3* produisent moins de cellules T  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  et  $CD4^+IL-21^+$  comparées aux souris avec un allèle NOD en *Idd6.3*. Ces différences ont été trouvées pour les cellules immunitaires de la rate mais également du thymus. Ces cellules n'ont de plus pas le même effet diabéto-gène, les cellules T  $CD4^+$  issus des lignées porteuses de la version NOD d'*Idd6.3* entraînant une incidence de diabète bien supérieure (80%) à celles issues des lignées porteuses de l'allèle C3H d'*Idd6.3* (20%) une fois injectées à des souris NOD.SCID. Nous avons pu démontrer que cette différence est due au fait qu'ARNTL2 se lie de façon spécifique au site de liaison de l'ARN polymérase 2 du promoteur d'*Il-21* et inhibe son expression dans les souris congéniques NOD.C3H portant un allèle C3H sur le locus *Idd6.3* mais semble en être incapable dans les lignées de souris porteuses d'un allèle NOD d'*Idd6.3*.

Dans un deuxième temps nous avons disposé de souris NOD.B6 *Arntl2*<sup>-/-</sup> qui nous ont permis de confirmer que ces phénomènes étaient directement liés à *Arntl2*, l'inactivation du gène augmentant également la proportion de cellules immunitaire et bloquant la liaison sur *Il-21*. Le travail sur les lignées NOD.B6 *Arntl2*<sup>-/-</sup> a également démontré que la non fonctionnalité de ce gène conférait une augmentation de la résistance à l'apoptose des thymocytes ainsi qu'une amplification de l'activité diabéto-gène des splénocytes. D'autres tests ont révélés que cette résistance à l'apoptose passait par IL-21, en effet des injections de cette cytokine apportaient la même augmentation de la résistance que l'augmentation d'IL-21 trouvée dans les lignées ne disposant pas d'une version fonctionnelle d'*Arntl2*.

Ces nouveaux résultats mettent en avant un rôle inattendu d'*Arntl2* dans l'équilibre immunitaire par son contrôle de l'expression d'*Il-21* ainsi que dans la sélection thymique des cellules T par le biais de l'apoptose et l'activité diabéto-gène des splénocytes qui s'écarte de ses fonctions connues de régulation du rythme circadien.